



TITLE:

バクテリオロドプシンの光化学反応経路の解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

岩佐, 達郎

CITATION:

岩佐, 達郎. バクテリオロドプシンの光化学反応経路の解析. 京都大学, 1980, 理学博士

ISSUE DATE:

1980-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2349>

RIGHT:



京都大学 理学博士
学位申請論文

岩佐 達郎

京都大学理学博士學位申請論文

バリタリオロドフィンの
光化学反応経路の解析

京都大学大学院理学研究科
生物物理学専攻
生体高分子反応学講座

岩佐 達郎

目 次

	頁
第 1 章 序 論	1
第 2 章 実験材料と方法	
第 1 節 紫膜試料の調整	
1. <u>Halobacterium halobium</u> の培養	16
2. <u>紫膜の精製</u>	17
3. <u>低温スパクトル測定</u> 用試料	18
第 2 節 低温スパクトルの測定	
1. <u>低温スパクトル測定</u> 用フェワー	19
2. <u>分光光度計・照射光</u> 源	20
第 3 章 実験結果	
第 1 節 トランス・バクテリオ	

ロドプシンの光反応

1. バソートランス バリテ
リオロドプシン (batho-
bR^t) は trans-bR の第一
光産物である。

23

2. Batho-bR^t は熱的にル
ミ, メタ中間体に変化
し, trans-bR にもどる。

33

3. Lumi-bR^t から直接
trans-bR にもどる反応経
路がある。

42

第2節 Trans-bRの光反応中間 体の吸収スペクトル

48

1. $\frac{d\epsilon^L}{d\epsilon}$ を求める。

50

2. β , β 及び $\frac{\epsilon^L}{\epsilon}$ を求める
ための計算式

54

3. Lumi-bR^t, batho-bR^t
の吸収スペクトルを求
める。

55

4. Lumi-bR^t と meta-bR^t

の差吸収スペクトルを 求める方法	56
第3節 Trans-bRの光感受性	64
第4章 議論と考察	
第1節 Trans-bRの光化学反応 中間体について	
1. <u>中間体"N", "O"が観 察されなかったこと について</u>	73
2. <u>ヒソソ中間体が存在 しないことについて</u>	75
第2節 Trans-bRの光化学反応 経路について	77
第3節 Trans-bRと batho-bR ^T の 間の光反応の量子収率 が温度に依存しないこ とについて	81
第4節 Trans-bRとその光反応 中間体の吸収スペクト	

ルについで

84

第 5 章 要約

88

第 6 章 謝辞

91

第 7 章 文献

92

バリテリオロドプシンの 光化学反応経路の解析

第1章 序論

バリテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌 *Halobacterium halobium* の産生する紫膜に含まれている蛋白質である。この紫膜は bR を唯一の蛋白質の膜構成成分として含んでいて、bR は乾燥重量で膜全体の 75% を占めている⁽¹⁾。残りの 25% は脂質であり、bR 1 分子当り脂質 10 分子が存在することになる⁽²⁾。

紫膜を含む菌は呼吸の関与なしに、光によって培地の pH 低下⁽³⁾ や菌体内の ATP 合成⁽⁴⁾ をひまおこなす。また、単離した紫膜でも光によるプロトンの放出を起こすことができる⁽³⁾。これらを指標にしたすべての作用スペクトルは bR の吸収スペクトルと一致するので⁽⁴⁾、bR が光を吸収して光化学反応を起こし、この光化学反応の結果プロトンポンプとして

働き、膜を介してプロトンの濃度勾配をつくると説明された。Mitchellの化学浸透説で説明されるように、菌体はこのプロトンの濃度勾配を利用してATPを合成すると考えられる。

このようなbRによる光エネルギーの化学エネルギーへの転換機構、すなわち、bRの光によるプロトンポンプ作用の機構を理解するためには、まず、その原動力となるbRの光反応過程での蛋白質や発色団の構造変化を知ることが必要であると考え、研究をすすめてきた。本論文はこれまでの著者の研究をまとめたもので、紫膜を試料として用いたbRの光反応中間体、光化学反応経路についての研究と、その結果より求められた各光反応中間体の吸収スペクトルが示されている^(5~7)（基礎となる論文1~3）。

後に少し詳しく述べるが、bRの光反応中間体や、その反応経路については議論があり、今だ統一的見解はない。そのため、当然ではあるが、光反応中間体の吸収スペクトルも

多くの仮定のもとに報告されていた^(8~10)。本論文はこれらの問題に対する、低温スペクトルを用いた研究による一つの解答である。以下、紫膜とbRの性質、その光反応について論じ、本論文の位置付けを行なう。

Halobacterium halobium の菌体をフリーズフラクチャーレプリカ法によって電子顕微鏡で観察すると、細胞膜のP面(細胞質側)では、一見規則正しい構造の紫膜と大きな粒子の散在する赤膜とが見える⁽¹¹⁾。HendersonとUnwinは紫膜を染色することなく、電子線で照射し、その回折像を得た^(12,13)。その結果によると、bR分子は紫膜中では三分子の単量体が会合した三量体をつくり、その三量体が三回対称軸を持つ六方格子をつくっている。さらに、単量体は膜に垂直な7本のα-ヘリックスから構成されていて、3本が内側に、4本が外側に並んでいる(図1)。

ここで、注意しておくべきことは、bR分

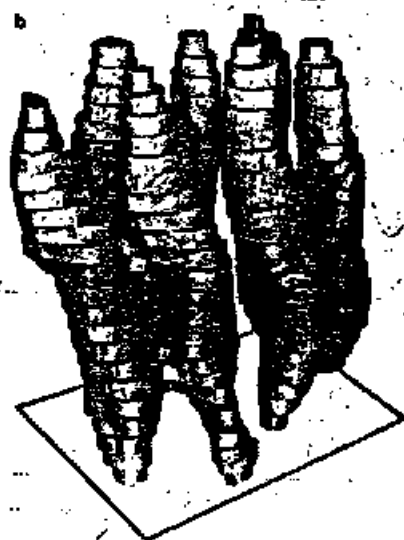


図 1 a: 電子線を紫膜面に垂直に照射して得られた投影構造⁽¹³⁾。 bR分子は紫膜上では三量体を構成している。鎖線は単量体を示している、単量体は7本の α -ヘリックスからなる。

b: bRの単量体のモデル⁽¹²⁾。7本の α -ヘリックスが直立している。図の上側が細胞質側である。

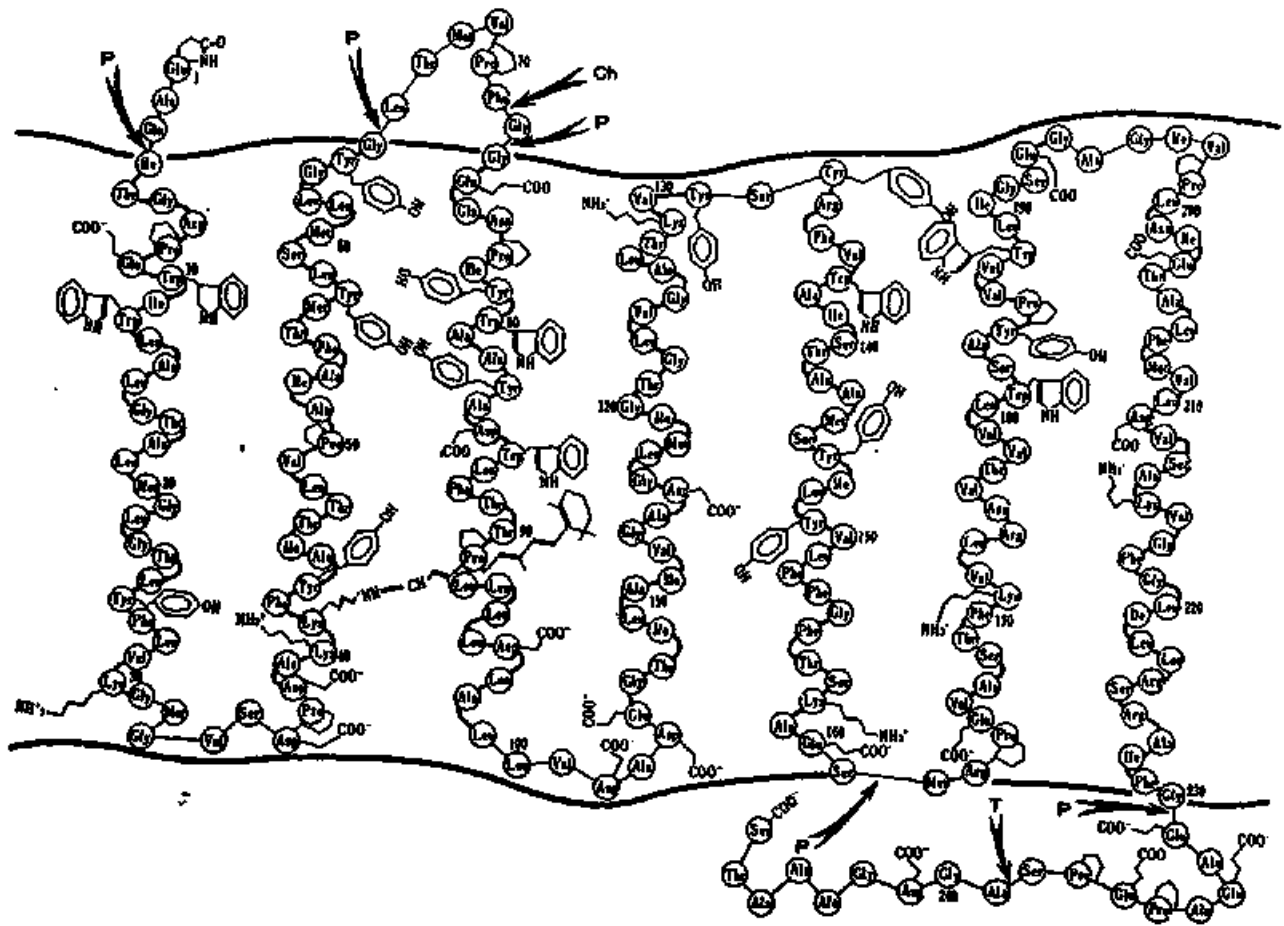
✓

子が三量体をつくって、膜面中で規則正しい構造をとっていることである。紫膜の内二色性(CD)スペクトルは、吸収スペクトルの吸収極大を境に大きな正と負のシグナルを示す。紫膜を非イオン性界面活性剤 Triton X-100 など処理して可溶化してやると、この正負のシグナルは消え、小さな正のシグナルを示すようになり、そのシグナルの極大は吸収極大の波長にほぼ一致する⁽¹⁴⁾。これは三量体を構成するbR分子中のレチナール間の相互作用によるものと考えれば説明できる。そこで、EbreyらはこのCDシグナルを解析し、レチナールの配置を決定した⁽¹⁵⁾。その結果、分子の中心間距離はほぼ15Åであると計算した。重要なことは、三量体の中でレチナール同志が相互作用をしているということであり、そのため、単量体間のenergy transfer⁽¹⁶⁾などの相互作用が起こり、光反応のtime courseを複雑なものにしている(第3章、第1節・3)。

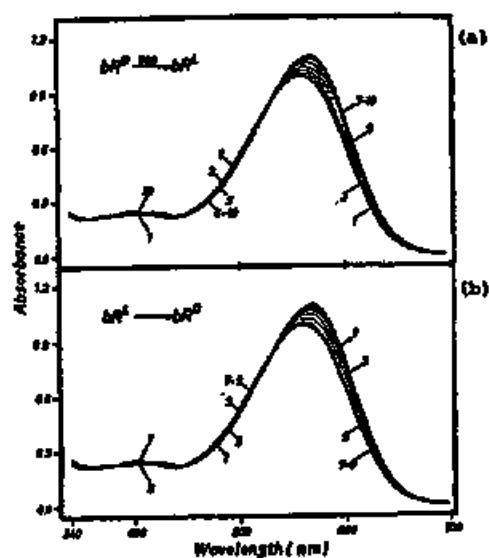
bR の単量体は視物質ロドプシンと同様に一分子のレチナールを発色団としてもっている⁽¹⁾。 bR の分子量は 26000 とされている。

最近、bR の生アミノ酸配列がスウェーデンのカルーフによって報告された^(17,18)。 Ovchinnikov 等のカルーフによって報告された結果を図 2 に示した。 bR の発色団レチナールは 41 番目のリジン残基の ε-アミノ基にシッフ塩基結合している⁽¹⁷⁾。 そして、光反応によって、シッフ塩基結合部位でプロトンが移動することが、後述するようには、bR のプロトンポンプ作用の原動力となっていると考えられている。

bR を常温で暗中に放置しておくと、560 nm に吸収極大をもつ定常状態（暗順応型 bR； bR^D ）になる⁽¹⁾。 この bR^D に常温で光を照射すると、吸収極大が 570 nm に移動した明順応型 bR (bR^L) になる（図 3a）。 これを常温で暗中に放置しておくと、もとの bR^D にもどる（図 3b）。 bR を常温で光照射しても、発色団レチナールと蛋白質に分解しないところは



図、2 紫膜中のbRの全アミノ酸配列 (17)。 図
 の下側が細胞質側になる。 図中の矢印
 Pはパロインで、Tはトリロシンで、Ch
 はキモトリロシンで切断される場所を示
 す。 左から2番目の α -ヘリックス鎖に
 ある4番目のリジンにレタナールが結合
 している。



bRの明順応(a)と暗順応(b) (21℃)

- (a) bR^D (曲線1) に560 nmの光を各々合計で10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560秒照射してbR^L (曲線10) を得た。
 (b) bR^L (曲線1) を21℃で各々合計 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640分暗保してbR^D (曲線10) を得た。

図・3 bRの明順応(a) と暗順応(b)。

参考

論文・3 から転写

視物質はドポシンと異なる。この状態変化は、レタナールの異性化反応であることがわかっている。つまり、 bR^L , bR^D 各々の発色団を抽出して高速液体クロマトグラフを用いて調べたところ、 bR^L からは trans-レタナールが、 bR^D からは trans と 13-cis-レタナールとが等モルずつ得られた^(19,20) (参考論文 2)。ここで、trans-レタナールを発色団とする bR を trans- bR , 13-cis-レタナールを発色団とする bR を 13-cis- bR と呼ぶことにする。

著者ら^(19,21) (参考論文 1,2) や Sperling ら⁽²²⁾ の研究によつて、trans- bR と 13-cis- bR は各自の光反応を示すことが明らかにされた。図・4 に -190°C での bR^L と bR^D の光反応をまとめてある⁽²¹⁾。 -190°C で 500 nm の光を照射すると、 bR^L は 1 つの光平衡状態 (State^L) しかとらないが、 bR^D では違った光平衡状態 (State^{D-I}) が二種の長波長産物 (batho-product) の混合物であるため、710 nm の光照射によつて新たな光平衡状態 (State^{D-II}) を生成する。

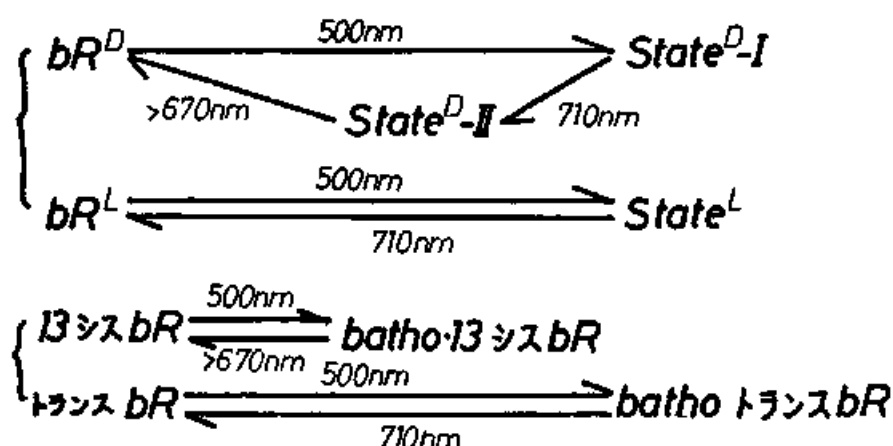


図4 bR^D , bR^L の -190°C での光反応のまとめ
 (参考論文1より改変)。 bR^L では、
 500nm の光照射でできた State^L は 710nm
 の光照射により bR^L へもどるが、 bR^D は
 710nm の光照射で新たな光平衡状態 (State^{D-II}) をつくる。これは bR^D 中の 13-シ
 ス- bR と トランス- bR が独自の光反応をし
 ていると考えれば説明できる。詳細は
 参考論文1を参照のこと。

この結果は $\text{trans-}bR$ と $13\text{-cis-}bR$ とが独自のバソ中間体を生成していることを示している。

この長波長移動した中間体は $\text{batho-}bR$ ($\text{batho-}bR^t$), $\text{batho-}13\text{-cis-}bR$ ($\text{batho-}bR^{13}$) と名付けられた。このような batho- 中間体の生成は視物質ロドプシンでもみられる⁽²³⁾。

ところが、ロドプシンでは液体ヘリウム温度 ($4\sim 9\text{ K}$) で光照射すると、吸収スペクトルの短波長移動したヒポロドプシンが生成する⁽²⁴⁾。最近、このヒポロドプシンが最初の光産物であることが明らかになったので^(25,26)、著者は bR の第一光産物としてヒポソ中間体のようなものが存在するかどうかを調べたが、その結果は否定的で、 bR の第一光産物は $\text{batho-}bR^t$ であると結論した (第3章 第1節 1)。

$\text{Batho-}bR^t$ は熱的に種々の中間体を通してもとの $\text{trans-}bR$ に変化する^(21,27)。図5に、

Lozier は⁽²⁷⁾ によって提出された bR の光反応経路を示す。これはレーガーフラッシュ・フォ

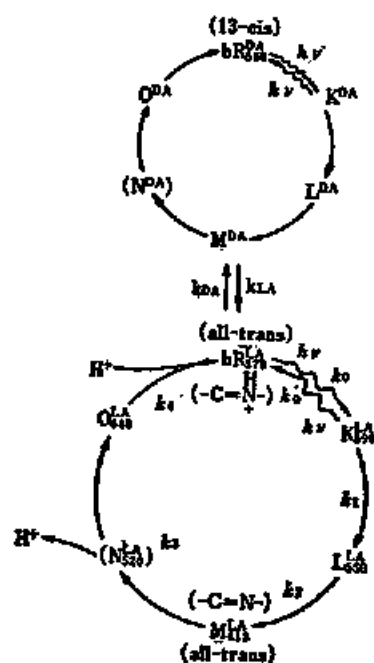


図5 Lozier らによって提出されているbRの光反応サイクル⁽²⁷⁾。 bR^{LA} , bR^{DA} は各々明順応型, 暗順応型bRを示す。また, 数字は吸収極大波長を, (13-cis), (all-trans)は発色団レタナールの構造を表わす。 bR_{570}^{LA} の Schiff 塩基結合はプロトン化していて, M_{412}^{LA} では脱プロトン化していることが示されている。

トリシスによって得られたものである。

bR^D は 13-cis-レタナールのおを発色団として
いると考えられていたが、これはまちがいで
あり、最近の彼らの総説⁽²⁸⁾で訂正している。

図・1では、trans-bR の光反応中間体として、
"K", "L", "M", "N", "O" 中間体が挙げ
られ、反応経路は直線的に進んでいる。図
に示されているように、trans-bR (図中 bR^{LA}₅₇₀)
ではレタナールとリジンのε-アミノ基との間
のシッフ塩基結合はプロトン化していて^(29, 30)
meta-bR^t (図中 M^{LA}₄₁₂) では脱プロトン化して
いる⁽²⁹⁾。最近の報告⁽³¹⁾では、L^{LA}₅₅₀ (lumi-bR^t)
の後、meta-bR^t より前の段階でシッフ塩基結
合の脱プロトン化が起こるという。このシ
ッフ塩基結合の脱プロトン化が引き金となり、
図・2に示されているようにbR分子中に多数存
在する解離基の間でプロトンの受け渡しが起
こり、meta-bR^t より後でプロトンの放出が観
察され、trans-bR にもどるときに再吸着され
る⁽³²⁾ という反応様式が考えられた。

ところが、最近 bR の光反応の研究が進むにつれて、光反応は図-5 に示されているほど単純でないことがわかってきた。中間体の生成や崩解の time course の片対数プロットが直線にならず (9, 33)、また、trans-bR の回復と "0" 中間体の崩解の時間経過が一致しない (34) など反応経路が枝わかれしていることが示唆され始めた。現在のところ、まだ統一的理解には達していない。また、これらの報告 (9, 27, 33, 34) はフラッシュ照射後の特定波長の吸光度変化を追跡しているため、結果の解析が複雑になる。特に、bR のように各中間体の吸収スペクトルが確定されていない段階ではより問題が複雑になるばかりである。

そこで、著者らは低温スペクトルの方法でこの問題を解決しようとした。この方法では吸収スペクトルが求められるので中間体の変化の追跡が簡単になる。その結果、trans-bR の光反応経路では lumi-bR^t のところで枝わかれがあり、その一部は meta-bR^t に変

化し、一部は直接 trans-bR に変化することがわかった(第3章 第1節 2.3)。また、この光反応経路の解析から bR の光反応量を求め、中間体の吸収スペクトルを計算した(第3章 第2節)。

また、trans-bR と batho-bR^t との間の光反応の time course を調べて、それらの間の光反応の量子収率が温度に無関係に一定であるという結果を得た⁽⁶⁾(第3章 第3節)。このとき、光反応過程の片対数プロットは直線にならなかった。恐らく、三量体中の bR 分子間のなんらかの相互作用のためであらうと考えている。

第2章 実験材料と方法

第1節

紫膜試料の調整

基本的には Oesterhelt と Stoekenius⁽³⁵⁾ の方法を用いた。

1. Halobacterium halobium の培養

Halobacterium halobium R₁ を下記成分の液体培地を用いて 39°C で培養した。1 l 中に NaCl 250g, CaCl₂ 0.2g, KCl 2g, Na₂-Malate 5g, MgSO₄ 7H₂O 20g, Na₃-Citrate 3g を含む Basal Salt 溶液に Peptone (Oxoid Bacteriological) を 10g の割合で溶かし, NaOH 溶液で pH を 7 に合わせた。Peptone 以外の試薬は 栄井化学 又は 和光純薬 の試薬特級を用いた。NaCl は食塩に置き換えても培養できる。

4 日から 5 日間, コンフォレックスを使って空気を吹き込み続けると, 菌の生育はほぼ定常状態に達する。紫膜の産生は低酸素濃

度、光照射によって誘導されるので⁽⁴⁾、空気の吹き込みを止め、 N_2 ガスと交換して低酸素条件にした。さらに、蛍光灯で光照射したまま、1日に数度 N_2 ガスを吹き込み、2-3日は放置しておく。

紫膜を産生した菌は Tominaga の No. 8 ローターを用いて $4^{\circ}C$ で連続遠心 (8000 r.p.m.) によって沈殿させ、Basal Salt にけん濁した。

2. 紫膜の精製

菌液に DNase を加え、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) 又は蒸留水に対して一夜遠析する。この遠析によって細胞は破壊され、膜断片となっている。これから粗大の異物をとりのぞくため、Tominaga No. 5 のローターを用いて $4^{\circ}C$ 、5000 rpm で20分間遠心する。膜断片は上清に上るので、次に日立 RP 30 のローターを用いて $4^{\circ}C$ 、25000 rpm で20分間遠心する。この遠心によって紫膜は沈殿し、他の膜断片 (赤膜) は上清に残る。沈殿をリン酸緩衝

液を用いてけん濁して、上清がほぼ透明になるまで遠心をくり返す。

ほぼきれいな紫膜が得られたわけであるが、これをさらにショ糖濃度勾配にかけて精製する。ショ糖濃度勾配は底に60%のショ糖-リン酸緩衝液をワッションとして置き、その上に50~30% (W/V) ($1.23 \text{ g/cm}^3 \sim 1.13 \text{ g/cm}^3$) の濃度勾配をつくる。この濃度勾配の上に試料を置き、日立RPS 25ローターを用いて、 4°C 、 2000 rpm で14時間以上遠心する。この遠心によって紫膜は 1.18 g/cm^3 の分画にバンドを形成し、赤膜はより軽い分画に集まる。紫膜のバンドを集め、リン酸緩衝液に対して 4°C で一晩透析してショ糖を除く。後遠心(日立RP 30, 4°C , 25000 rpm , 20分間)で数回洗う。

3. 低温スペクトル測定用試料

低温で吸収スペクトルを測定するためには試料をできるだけ透明に凍らせる必要があ

る。そのため紫膜をリン酸緩衝液にけん濁した後、3倍量の加里セロールを加え、15%加里セロール溶液 (V/V) にして試料とした。

1 M NaCl, pH 10 の紫膜けん濁液 (第3章第1節 3) を得るには、まず、紫膜けん濁液を 10 mM ボレート緩衝液 (pH 10) に対して4回で一夜透析する。次に、4 M NaCl - ボレート緩衝液で3回遠心して洗った後、少量の4 M NaCl - ボレート緩衝液でけん濁し、3倍量の加里セロールを加えた。その結果、最終濃度 1 M NaCl を含む加里セロール溶液を得た。

第2節

低温スベクトルの測定

1. 低温スベクトル測定用チューブ

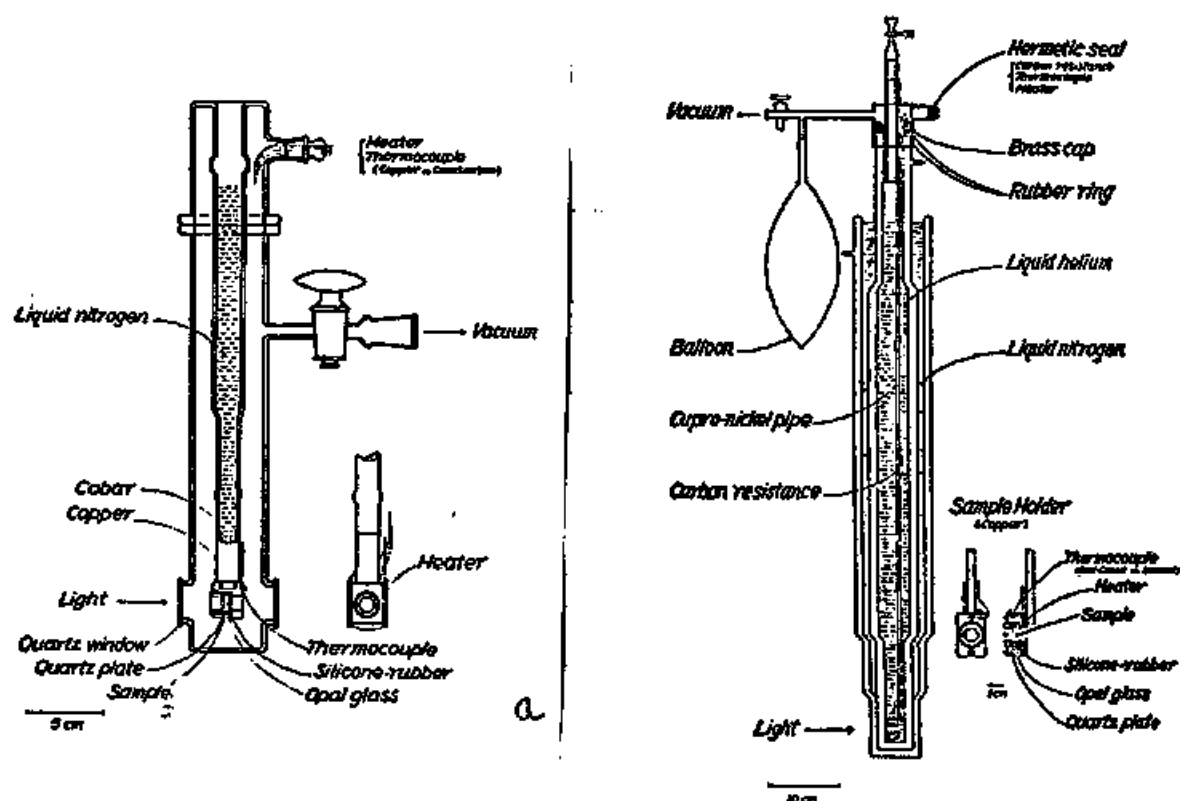
低温スベクトルの測定には Yoshizawa の設計によるチューブを使用した⁽³⁶⁾。図 6a に液体窒素温度以上の測定に用いたチューブを、図 6b に液体ヘリウム温度から液体窒素温度の

間の測定に使用したテューブを示した。試料は入射光の方向より、石英ガラス、シリコンガ－状のシリコンゴム（内径 10 mm, 光路長 1 または 2 mm）、オパールガラスからなる光学セルに充填されている。

試料の温度は、液体窒素用テューブ（図 6a）を用いた場合には銅-コンスタンタンの、液体ヘリウム用テューブ（図 6b）を用いた場合には金・コバルト合金-リロナルの熱電対をセルホルダーに接触させて測定した。177 K 以上の一定の温度が必要な場合には、液体窒素をテューブの冷却部に滴下し、温度を $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内に保った。

2. 分光光度計, 照射光源

測定に使用した分光光度計は Shimadzu の MPS-5000 型である。一部の実験には日立の 323 型を用いた。いずれの分光光度計もテューブを動かすことなく試料を光照射できるように、試料室を改造した。



図・6 低温スペクトルの測定に用いた装置
 (36). aは液体窒素温度以上の測定に、
 bは液体ヘリウム温度から液体窒素温度
 までの測定に用いた。

試料の照射用光源としては、Ushio社のキセノンランプ（500 W）を用いた。照射光の光路に干渉フィルター（東芝、日本光学）とカットオフフィルターの組みあわせ、又はカットオフフィルターのみを置いて必要な波長の照射光を得た。

第3章 結果

第1節

トランス-バクテリオロドポシン

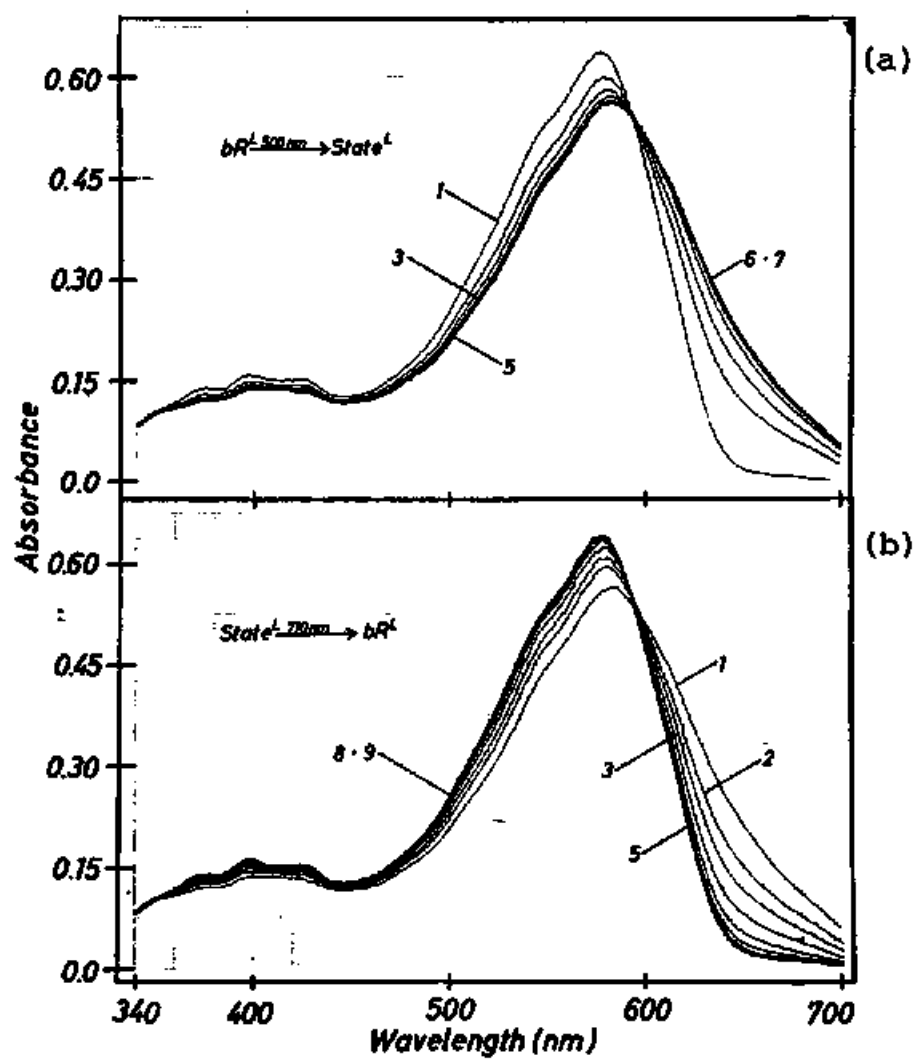
(trans-bR) の光反応

以下の実験ではすべて trans-bR (bR^L) を試料として用いて光反応を調べた。そのため、75% がリセロールを含む紫膜けん濁液 (10mM リン酸緩衝液) を 0°C で 500nm の光を用いて照射し、試料に含まれている 13-cis-bR を trans-bR に変えた。さらに光照射してもスバクトルに変化のないことを確認してから実験に用いた。

1. バソートランス-バクテリオロドポシン

(batho-bR^H) は trans-bR の第一光産物である。

0°C での trans bR の吸収極大の波長は 572nm であるが、-190°C では 583nm に移動する (図 7a)。このものを (曲線 1 図 7a), 500nm の光で照射すると、595nm に等吸収点



图·17

図 7 -190°C での trans-bR (bR^L) の光反応

a) 曲線 1; -190°C の bR^L, 曲線 2~7;

bR^L (曲線 1) に 500 nm の光をそれぞれ合計, 5, 10, 20, 40, 80, 160 秒照射した。最終的には光平衡状態 (State^L; 曲線 6 と 7) が得られた。

b) 曲線 1, State^L, 曲線 2~9, State^L

(曲線 1) に 710 nm の光をそれぞれ合計, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 秒照射した。最終的にはもとの bR^L (曲線 8 と 9) にもどった。

を持ってスペクトルが長波長移動した。このスペクトル変化は batho-bR^t の生成を示す。こうして作られた光平衡状態 (State^L; 曲線 7 図 7a) に 710 nm の光を照射すると、スペクトルは最初のスペクトルに一致した (図 7b) (21)。このことは、batho-bR^t がもとの trans-bR に変化したことを示している。

以上の結果は、バクテリオロドポシンも動物のロドポシン (バクテリオロドポシンと同じレチナールを発色団とする膜蛋白質であるが、11-cis-レチナールを発色団に持つ点異なる。) と同様に、 -190°C での光照射により長波長側に吸収極大をもつ中間体 (バソ中間体) に変化し、しかもその反応は光可逆的であることを示している (23)。バソ中間体の生成は今まで知られている天然の、レチナールを発色団とする蛋白質に共通してみられる性質であると言えよう (36)。

ところで、ワシ、またはイカのロドポシンでは、液体ヘリウム温度 ($-269 \sim -264^{\circ}\text{C}$),

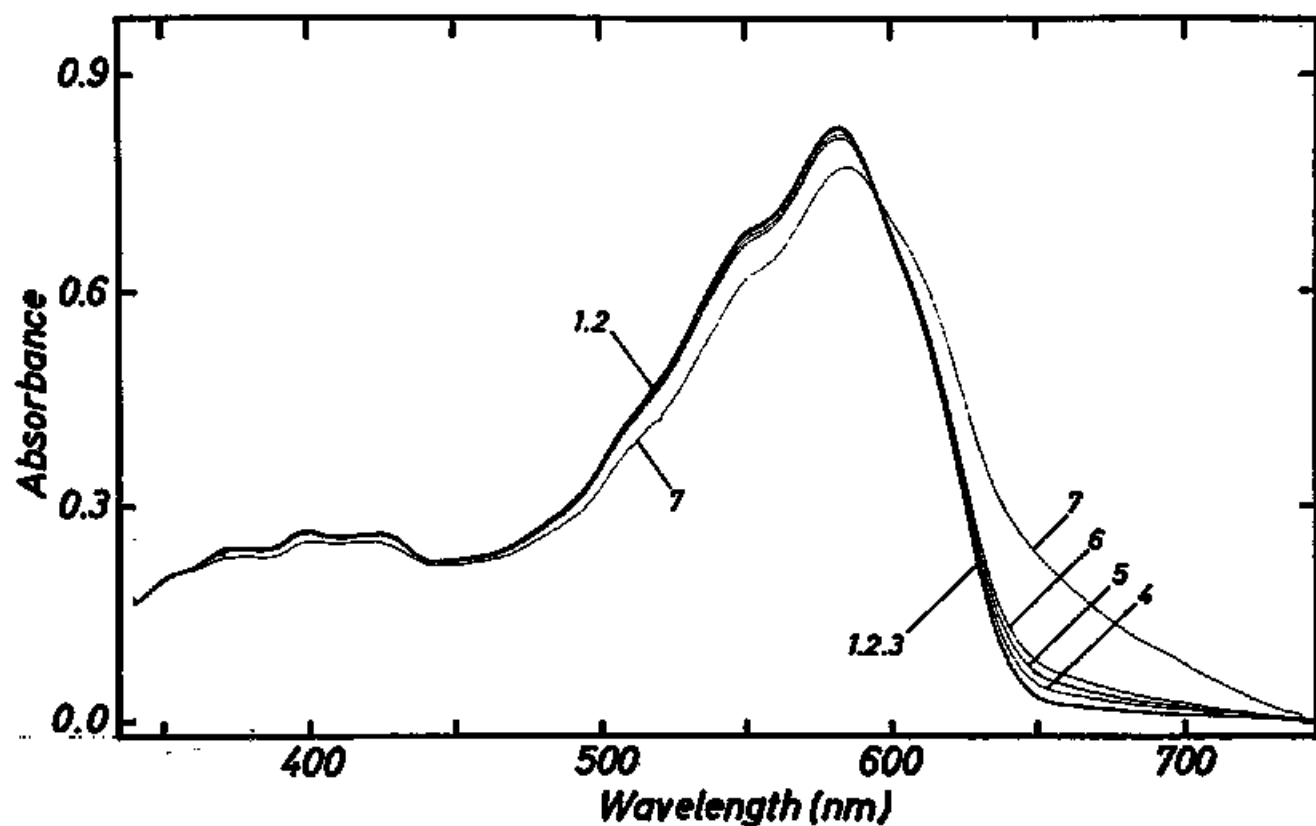
4~9K) で吸収極大より長波長側の光を照射すると、スペクトルの短波長側が観察された。この新しい光産物をヒソロドフィンと名付けた⁽²⁴⁾。最近、ピコ秒レーザーフラッシュフォトリシスの実験から、イカ⁽²⁵⁾、ワシ⁽²⁶⁾のロドフィンでは常温での光反応においてヒソロドフィンが第一光産物であることを示す結果が得られている。

そこで、バリテリオロドフィンでもヒソロドフィン中間体が存在するかどうかを調べた。

図8には 9K で trans-bR を種々の波長の光で照射したときの光平衡状態が示されている。ヒソロドフィンの生成はロドフィンを吸収極大より長波長側の光で照射したときによく観察されるので、まず、trans-bR を

660nm より長波長の光で照射した。図8の曲線乙が 660nm より長波長の光で10分間照射した後の吸収スペクトルである。Trans-bR の吸収スペクトルとほとんど同じである。

次に、照射する光の波長を徐々に短波長側に



図・8 9 k での trans-bR の光反応⁽⁵⁾。 Trans-bR (曲線 1) にそれぞれ 10 分間、660 nm 以上 (>660), >640, >610, >580, >560 nm の波長の光で照射して得た光平衡状態 (曲線 2~6)。曲線 7 は 510 nm の光を 10 分間照射して得られた光平衡状態を示す。

よせたが（曲線 3~7, 図 8）, 吸収スペクトルは短波長側へ移動せず, 逆に長波長側へ移動した。この結果は, trans-bR では動物のロドプシンにみられるような γ ソ中間体は観測されないことを示している。

さて, 図 8 の曲線 4~7 に示されている長波長側での吸収の増加は, -190°C (77K) で観測される batho-bR^t の生成と極めて類似している。図 9 に, 9K で観測された長波長移動に対応する差吸収 (○と△) を, 77K での batho-bR^t の生成の光反応の差吸収スペクトル (実線) と比較して示してある。図を見ると明らかなるようにそれらはほぼ一致している。しかし, 図に実線で示されている差吸収スペクトルは 77K で得られたものであり, ○や△で示されている差吸収は 9K での値である。一般に吸収スペクトルの形は低温にあることにより少し変化するので, 差吸収スペクトルの形が一致したからといって, 9K での光産物が 77K で生成している batho-bR^t と同じもの

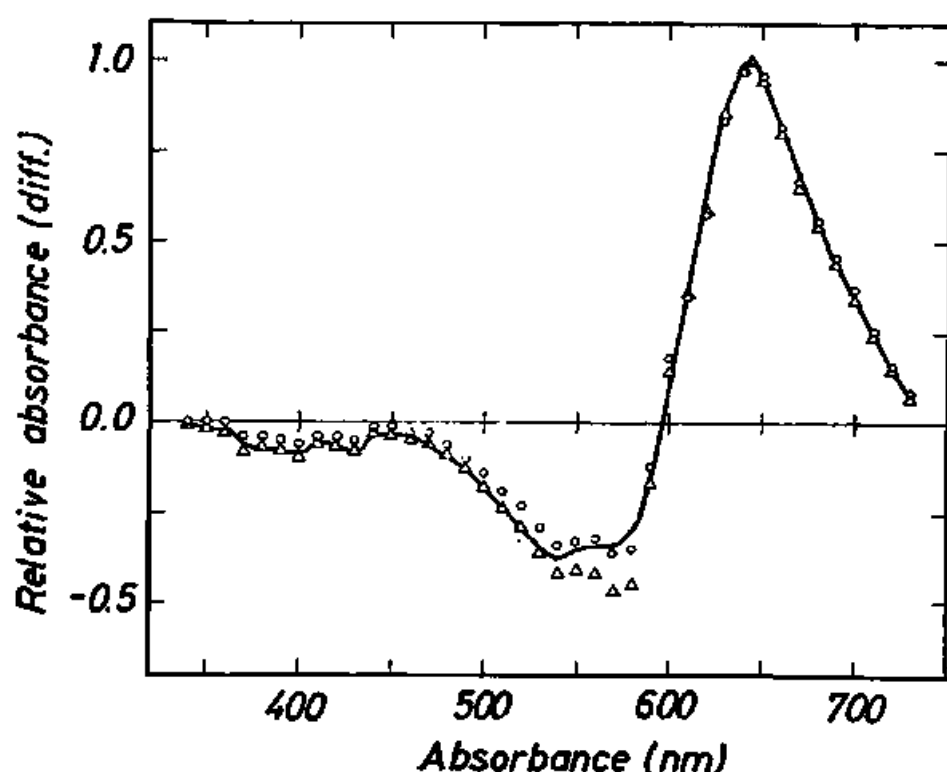


図 9 Trans-bR と 9 K で生成した光産物との
 差吸収スペクトル。 図 8 の曲線 1 と曲
 線 6 の (○), 曲線 1 と曲線 7 の (△)
 差吸収スペクトルが示されている。こ
 れらは 77 K での trans-bR と batho-bR⁺ との
 差吸収スペクトル (図 10 b の曲線 4 と曲
 線 5 から求められた 図中の実線) と一
 致している。 図中の差吸収はすべて、
 645 nm の値を 1.0 に合わせてある。

であるとは結論できない。

そこで、着目するはさらに次のような実験を行なった(図10)。まず 9 K で trans-bR に 510 nm の光を照射して吸収スペクトルの長波長移動した産物を生成させた(曲線2 図10a)。このものを 77 K まで昇温させて吸収スペクトルを測定した(曲線3, 図10b)。これを 77 K で 510 nm の光で照射し batho-bR^t を生成させた(曲線4 図10b)。曲線4と曲線3とを比較すると、両者はほぼ一致した。さらに、77 K で 660 nm より長波長の光で照射して, trans-bR を作ってから(曲線5), 再び 510 nm の光で照射して batho-bR^t を生成させた(曲線6, 図10b), これを 9 K まで冷却した(曲線7 図10a)。この曲線7は曲線2(9 K で生成した, 長波長移動した光産物のスペクトル)と一致した。

以上の結果は、9 K で batho-bR^t が生成すること、さらに、9 K と 77 K とで batho-bR^t の生成量に差のないことを示している。 図

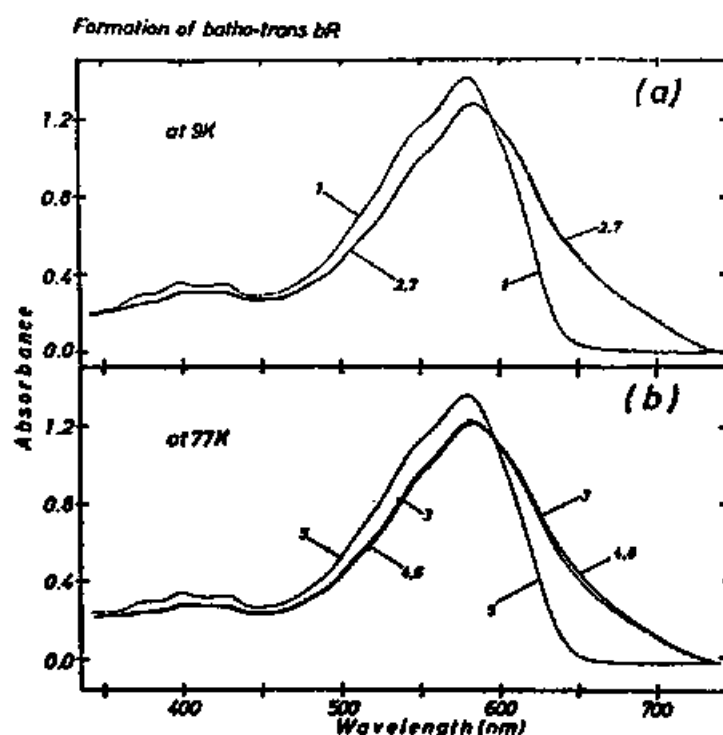


図 10 9 K で batho- bR^t が生成することを証明
 する実験: 9 K の trans- bR (曲線 1) に
 510 nm の光を照射して光平衡状態 (曲線
 2) を得た。これを 77 K で昇温させ
 曲線 3 を得た。曲線 3 を 510 nm の光で
 照射して光平衡状態 (曲線 4) を得た。
 これを 660 nm より長波長の光で照射して
 trans- bR に戻し (曲線 5), さらに 510
 nm の光で照射して曲線 6 を得た。これ
 を 9 K に冷却して曲線 7 を得た。

常光照射によってできた光平衡状態に含まれる batho-bR^t の量は trans-bR から batho-bR^t への反応と、その逆反応の各々の光感受性の比によってまってくる。そのため、9 K と 77 K とで batho-bR^t の生成量に差がないという結果は、この光感受性の比が両温度で等しいことを意味する。この結果についてはさらに詳しく本章の第3節 光感受性のところで述べる。

以上の結果から、trans-bR にはヒソソ中間体は存在せず、batho-bR^t が trans-bR の第一光産物であることがわかる。

2. Batho-bR^t は熱的にルミ (lumi), メタ (meta) 中間体に変化し、trans-bR にもどる。

次に、batho-bR^t がどのような熱反応を示して次の中間体に変化するのかを調べるために、batho-bR^t を暗中で昇温させる実験を行なった (図 11 a, b)。

まず、-190°C に冷却した trans-bR に 500

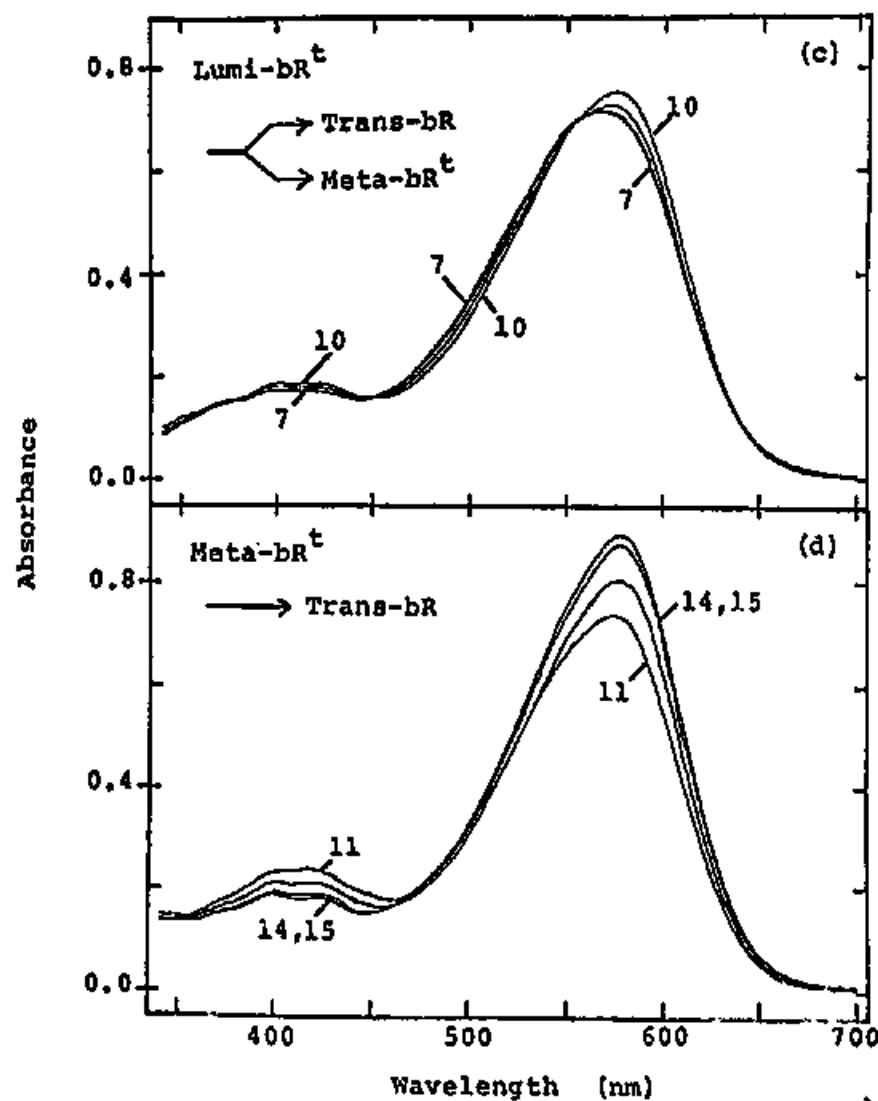
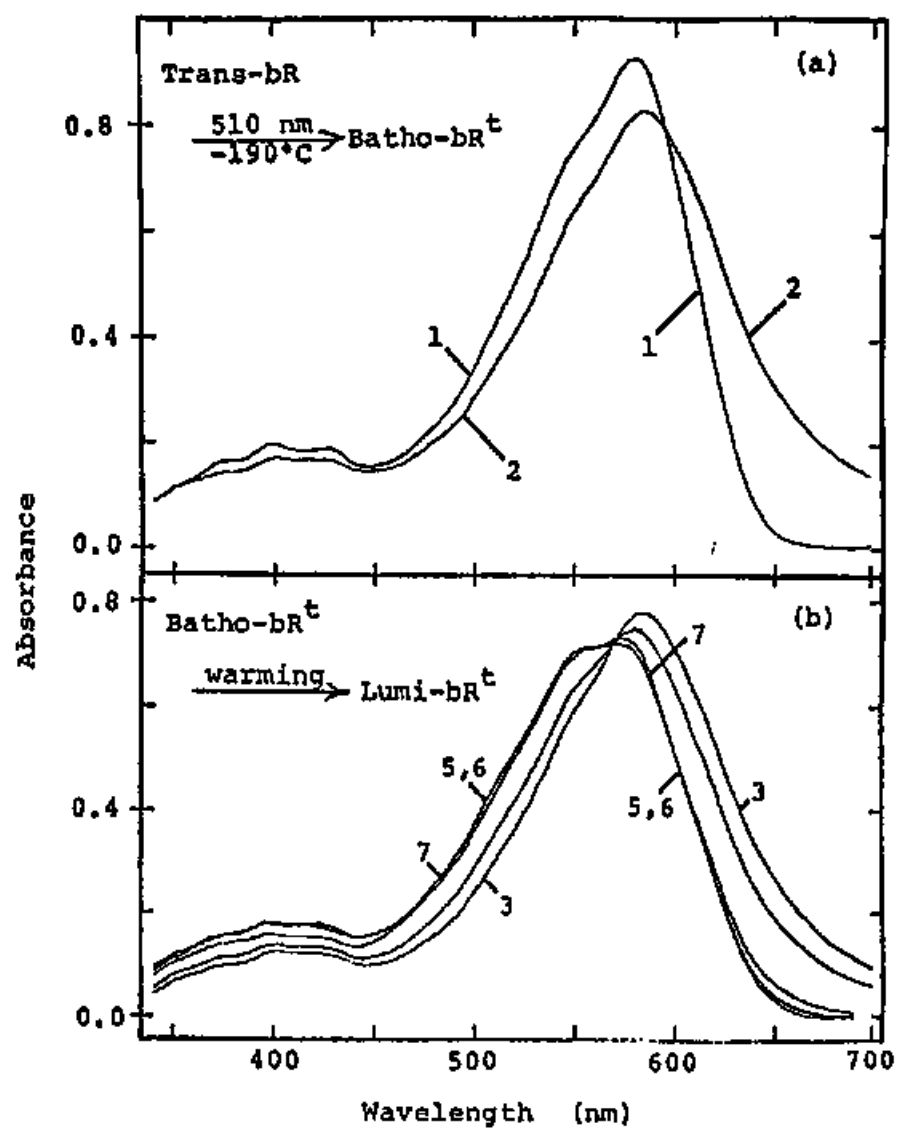


図 11 Trans-bR の光反応 (a) と熱反応 (b~d).
 Trans-bR としてかりセロール (75%) -
 リン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.6) にけん濁し
 た紫膜を用いた。吸収スペクトルは、
 図 a、b では -190°C で、図 c、d では -90°C で
 測定した。図 a~d もで同一試料による
 一連の実験である。

a: Batho-bR^t の生成。Trans-bR (曲線
 1) に 500 nm の光を -190°C で 10 分間照
 射すると, batho-bR^t が生成して光平衡
 状態 (曲線 2) になる。

b: Batho-bR^t から lumi-bR^t への変化。

Batho-bR^t を含む試料 (曲線 3, 図 a の
 曲線 2 に同じ) を暗中で, -120 , -105 ,
 -95 , -90°C まで昇温させ, 各昇温ごと
 に -190°C まで再冷却して吸収スペクト
 ルを測定し, 曲線 4~7 を得た。

c: Lumi- bR^t の熱反応 Trans- bR と

Lumi- bR^t との混合物 (曲線 7, 図 b の曲線 7 に同じ) を暗中で, -80 , -70 , -60°C まで昇温させ, 各昇温ごとに -90°C まで再冷却して吸収スペクトルを測定し, 曲線 8~10 を得た。

d: Meta- bR^t から trans- bR への変化

暗中で, -50 , -40 , -30 , -20 , -10°C まで昇温させ, 各昇温ごとに -90°C まで再冷却して吸収スペクトルを測定し, 曲線 11~15 を得た。

nmの光を照射して batho- bR^t を生成させた (図 11a)。次にこれを所要の温度まで昇温させ、再び -190°C に冷却して吸収スペクトルを測定した。図 11b には -90°C まで昇温させたときの吸収スペクトルの変化が示されている。 -120°C までは吸収スペクトルの変化はほとんど見られなかった。つまり batho- bR^t はこの温度まで安定である。

吸収スペクトルは -120°C から徐々に短波長側へ移動した (図 11b)。 -95°C まで昇温した試料の吸収スペクトル (曲線 6、図 11b) は -105°C まで昇温したもの (曲線 5、図 11b) と一致しているから、batho- bR^t から生成してえた産物は -95°C 以下で安定であると¹⁵考えられる。 -90°C まで昇温すると、吸収スペクトルは新たな変化を示しはじめた (曲線 7、図 11b)。

Lozsev らは、フラッシュフォトリシスの結果から batho- bR^t から “L” 中間体が生成すると報告している⁽²⁷⁾。本実験で得られた曲線

6 と 3 (図 11 b) の差吸収スペクトルの極大が 510 nm にあり、これは "L" 中間体と trans-bR の差吸収の極大と一致した。著者らはこの中間体を lumi-trans-bR (lumi-bR^t) と名付けた。

図 11 c と d には lumi-bR^t の熱反応にともなう吸収スペクトル変化が示されている。Lumi-bR^t は -90°C から変化し始めるが、-90°C より高い温度では今まで凍結していた試料がとけたすために、-190°C まで再冷却すると吸収スペクトルのベースラインが変化する恐れがある。そこで、図 11 c と d に示されている吸収スペクトルはすべて -90°C で測定された。

図 11 c に示されている -50°C までの lumi-bR^t の熱反応は複雑である。吸収スペクトルの 450 から 557 nm の間の吸光度の減少は lumi-bR^t の減少に対応する。Lumi-bR^t が変化した結果、420 nm 付近と、557 nm より長波長側の吸光度が増加した。

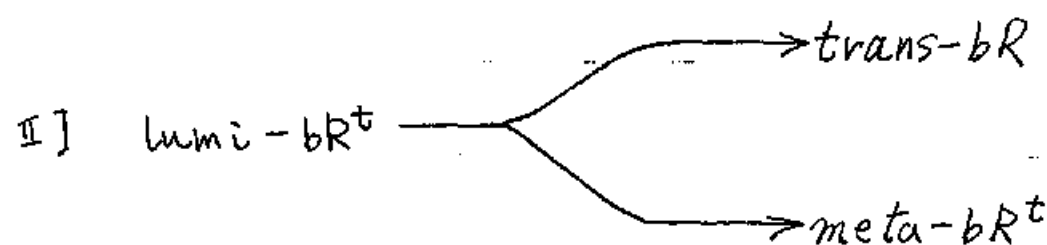
図 11d には -50°C 以上の吸収スペクトルの変化が示されているが、ここでは短波長側 ($< 463\text{ nm}$) の吸光度が減少し、長波長側の吸光度の回復がみられる。このスペクトル変化は Logier らによって報告されている“M”中間体⁽²⁷⁾から trans-bR への変化と対応していると考えられる。著者らはこの“M”中間体を meta-trans-bR (meta-bR^t) と呼ぶことにした。この結果は lumi-bR^t から meta-bR^t が生成したことを示している。

また、 -20°C で昇温させた試料の吸収スペクトル (曲線 14: 図 11d) は trans-bR のそれと一致した。つまり、 trans-bR は光を受けると batho-bR^t に変化し、熱的に lumi 、 meta という中間体を経て元の trans-bR にもどるという結果が得られた。この結果は著者らの報告⁽²¹⁾と矛盾しない。

図 11d の結果を考慮して、図 11c を考察すると、短波長側 (420 nm 付近) の吸光度の増加は lumi-bR^t から meta-bR^t が生成したこと

に対応することがわかる。ところが、このときの長波長側での吸光度の増加は meta-bR^t の生成では説明できない。というのは、 meta-bR^t は 480 nm より長波長側には吸収をもっていないからである⁽³⁷⁾ (図12参照)。では、この長波長側での吸光度の増大は何に由来するのであろうか。図11dには meta-bR^t から trans-bR への変化しか示されていない。また、最終産物 (曲線15, 図11d) は trans-bR で他のものは含まれていない。このことから、図11cで観察された長波長側での吸光度の増大は trans-bR の生成によるものであると結論される。

それではこの trans-bR はどのような反応経路で生成して来たのであろうか。著者は次の二つの可能性を考えた。



I の反応経路は直線的な枝わけのないもので、 lumi-br^t から生成した meta-br^t が直ちに trans-br に変化していくために長波長側での吸光度の増大が観察される。II で示されている反応経路は lumi-br^t から一部は trans-br に、一部が meta-br^t に変化するという枝わけられた反応経路である。この説明では、 trans-br は直接 lumi-br^t から生成することになる。現在まで反応経路のどこかで枝わけがあるだろうということとは想像されてきたが^(34,38)、スペクトル的にはっきりと示した報告はまだない。

そこで、著者らは meta-br^t を安定化させることによって、ふたつの反応経路のどちらが正しいかを調べた。もし、I の反応経路が正しいならば、 meta-br^t を安定化させることによって、図11aで観察された長波長側の吸光度の増大はみられなくなるはずである。

II の反応経路が正しいければ、 meta-br^t を安定化させても、図11cと同様の結果を得るはず

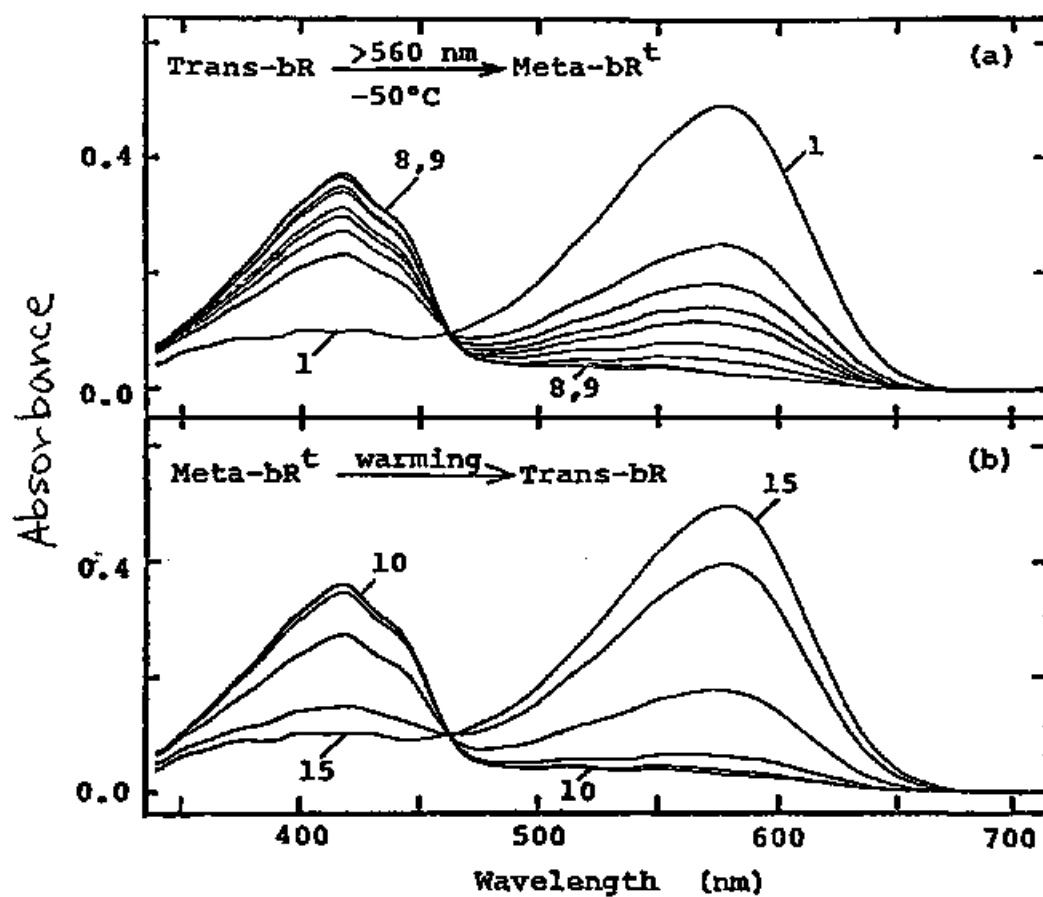
である。

3 Lumi-bR^t から直接 trans-bR に変化する反応経路がある。

Meta-bR^t を安定化させる方法としては、エーテル溶液を使う⁽³⁷⁾、または高塩濃度、高 pH (1 M NaCl, pH 10) の溶液を使う⁽³⁹⁾ という方法がある。著者はここで後者の方法を採用することにした。

図 12 に は、1 M NaCl を含むホレート緩衝液 (10 mM pH 10) にけん濁した紫膜中では meta-bR^t が安定に存することが示されている。

-50°C の trans-bR を 560 nm より長波長の光で照射すると、すべての bR が meta-bR^t に変換する (図 12a)。このようにして作られた meta-bR^t は -40°C 手では安定で、それ以上の温度できれいな等吸収点を作って変化する (図 12b)。この等吸収点の波長 (463 nm) は bR から meta-bR^t への光反応のとまに形成される場合と同じであるから、この熱反応は



12

図 12 1 M NaCl, pH 10 の溶液中で meta-bR^t が安定になることを示す図

a: -50°C の trans-bR (曲線 1) に 560 nm 以上の光をそれぞれ合計 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 分照射して曲線 2~9 を得た。曲線 9 は meta-bR^t を示す。

b: Meta-bR^t (曲線 10) を, $-40, -30, -20, -10, 0^\circ\text{C}$ までは昇温し, 各昇温ごとに -50°C までは再冷却して吸収スペクトルを測定し, 曲線 11~15 を得た。

meta-bR^t から直接 trans-bR へ変化していることを示唆している。

ともかく, meta-bR^t は pH.10, 1 M, NaCl 溶液中では -50°C まで安定であることが確認されたので, この試料を 0°C まで昇温してすべて trans-bR に変化させた後, -190°C まで冷却した。500 nm の光を照射して batho-bR^t を生成させた後, 昇温させたときの吸収スペクトル変化が図 13a.b に示されている。図 13a には -90°C までの昇温過程, つまり, batho-bR^t から lumi-bR^t への変化が示されている。この変化は図 11b とほぼ同じであり, 高塩濃度高 pH という条件はこの過程に対して大きな影響を与えていないようである。

図 13b には, -90°C での昇温産物の吸収スペクトルと, それらを -70, -50°C まで昇温したときの産物の -90°C でのスペクトルが示されている。この条件では meta-bR^t が安定であるにもかかわらず, 長波長側での吸光度の増加が観察された。この結果は II の反

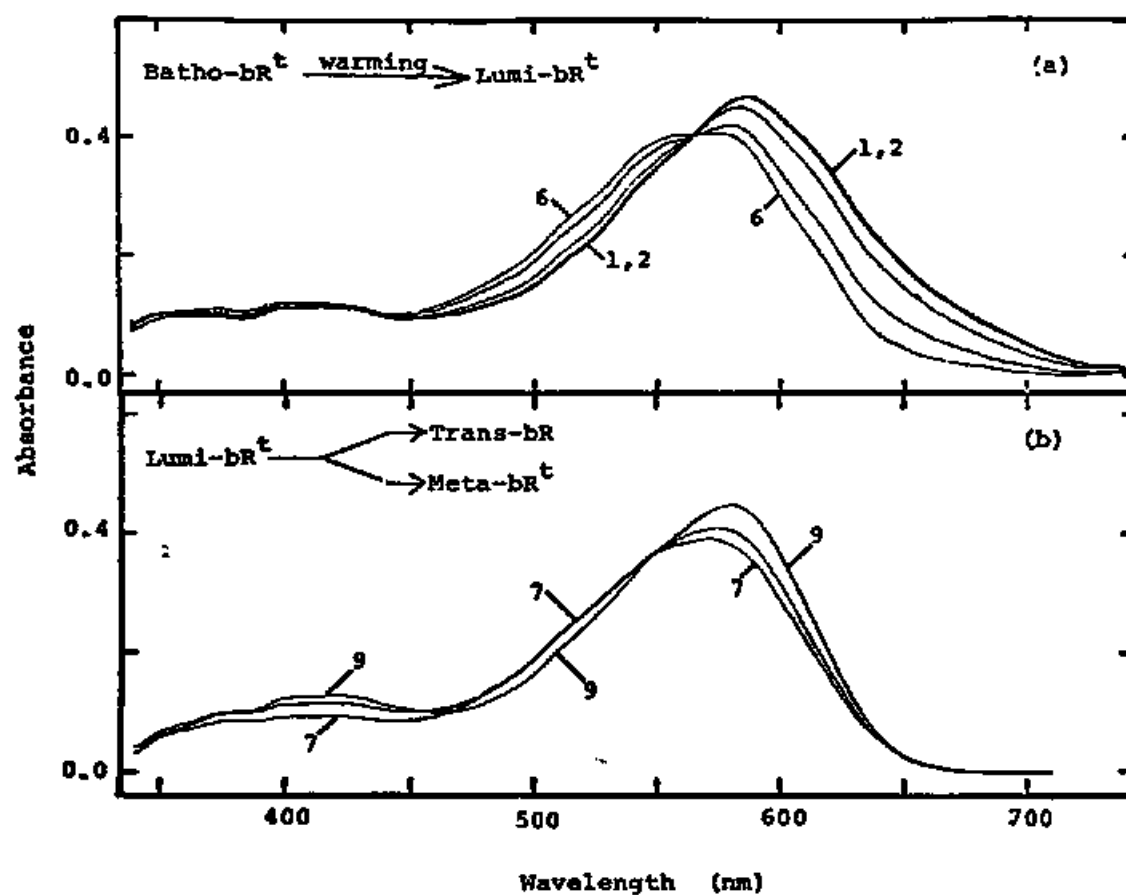


图 13

図 13 1 M NaCl, pH 10 の溶液中での batho-bR^t の熱反応

a: Batho-bR^t の熱反応. Batho-bR^t を含む試料 (曲線 1) を暗中で -150 , -130 , -110 , -100 , -90°C まで昇温し, 各昇温ごとに -190°C まで再冷却して吸収スペクトルを測定し, 曲線 2~6 を得た。

b: Lumi-bR^t の熱反応. 図 13 a の試料 (曲線 6) を -90°C で測定し (曲線 7), それを -70°C と -50°C まで昇温し, 各昇温後 -90°C で吸収スペクトルを測定して, それぞれ曲線 8 と 9 を得た。

応経路の正しいことを示し, lumi-br^t から meta-br^t と trans-br の両方へ直接変化することを示している。

第2節

Trans-br の光反応中間体の吸収スペクトル

Trans-br は光を受けた後, batho-, lumi-, meta-br^t を経て trans-br へ変化するが, lumi-br^t からは直接 trans-br へも変化することがわかった。次にこれらの中間体の吸収スペクトルを求めた。吸収スペクトルを正確に計算するためには, trans-br の何%が光反応を起して batho-br^t に変化したかを知ることが必要である。逆に, 吸収スペクトルが正確にあければ, それをもとに光反応した分子数を求めることができる, br の光反応の量子収率や光によるフロン移動の効率も正確に計算することができる。しかし, これまで光反応量を正確に求めることができなかった。

め、正しい吸収スペクトルは求められていないと言っている⁽²⁸⁾。

著者らは以下の様な方法によって光反応量を求め、batho-, lumi-bR^tの吸収スペクトルを求めることができた。

図13bの曲線7, 9で示される吸光度はそれを次のように表わすことができる。

$$A^7 = C^R \cdot \epsilon^R + C^L \cdot \epsilon^L \quad (1)$$

$$A^9 = C^R \cdot \epsilon^R + \alpha \cdot C^L \epsilon^M + \beta \cdot C^L \cdot \epsilon^R \quad (2)$$

$$\alpha + \beta = 1 \quad (3)$$

A, C, ϵ はそれぞれ吸光度, 濃度, モル吸光係数を示し, 右肩の添字, 7, 9, R, L, M はそれぞれ, 曲線7, 曲線9, trans-bR, lumi-bR^t, meta-bR^tを示す。 α , β は lumi-bR^tのうち meta-bR^tに変化したものと, 直接 trans-bR に変化したものの割合を示す。最初の trans-bR の濃度を C_0 とすると (4) 式の子

うになる。

$$G = G^L + G^R \quad (4)$$

$\frac{G^L}{G}$ が求められれば lumi-br^t の吸収スペクトルを計算することが出来るが、直接 $\frac{G^L}{G}$ を求められないので以下の順を追って求めていった。まず、1. $\frac{dG^L}{G}$, すなわち全体のどれだけが meta-br^t に変化したのかを求め、次に、2. $\frac{dG^L}{G}$ を使って以下のようにして $\frac{G^L}{G}$ を求めるかを示し、3. 実際に吸収スペクトルを計算した。

1. $\frac{dG^L}{G}$ を求める。

図13bの曲線7と曲線9の差吸収 (A^{7-9}) (—●—; 図14a) は次のように表わせる。

$$\begin{aligned} A^{7-9} &= \alpha \cdot G^L (\varepsilon^L - \varepsilon^M) + \beta \cdot G^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R) \quad (5^*) \\ &= \alpha \cdot G^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R) - \alpha \cdot G^L (\varepsilon^M - \varepsilon^R) \\ &\quad + \beta \cdot G^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R) \end{aligned}$$

14

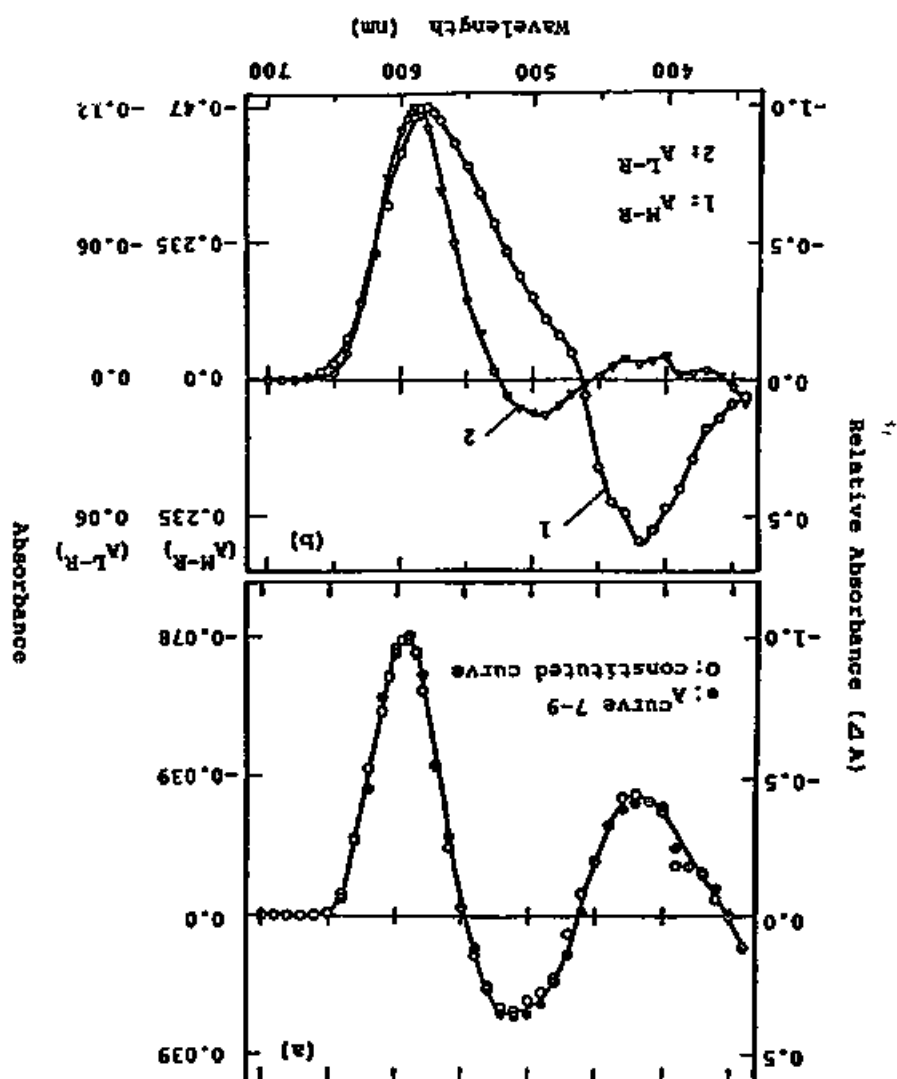


図 14 $\frac{d \cdot C^L}{C}$ を求めるための図

a: $A^{\text{curve 7-9}}$ は、図 13 b の曲線 7 と曲線 9 の差吸収を示す。Constituted curve (O) については本文参照 (p. 54)。

b: A^{M-R} は $-90^\circ C$ での meta- bR^t と trans- bR の差吸収で、meta- bR^t (曲線 10, 図 12 b) と trans- bR (曲線 15, 図 12 b) を $-90^\circ C$ で測定したものから計算した。
一方、 A^{L-R} は $-90^\circ C$ での Lumi- bR^t と trans- bR との差吸収で、図 13 b の曲線 7 と、trans- bR (曲線 15, 図 12 b) を $-90^\circ C$ で測定したものから計算した。

$$= d \cdot c^L \cdot (\epsilon^L - \epsilon^R) - d \cdot c^L (\epsilon^M - \epsilon^R) \quad (5)$$

ところで, lumi-br^t と trans-br の等吸収点
525 nm にあることは実験的にわかっている
(参照: 図 14b の曲線 2 に示されているように
lumi-br^t と trans-br の差吸収 (A^{L-R}) は 525
nm で零になる。つまり, ϵ^L と ϵ^R が 525 nm で
等しい。)。従って, A^{7-9} は 525 nm では次
のようになる。

$$A_{525}^{7-9} = -d \cdot c^L (\epsilon_{525}^M - \epsilon_{525}^R) \quad (6)$$

よって, $\frac{d \cdot c^L}{c}$ は次式のよう表わせる。

$$\frac{-d \cdot c^L}{c} = \frac{A_{525}^{7-9}}{A_{525}^{M-R}} = \frac{0.078 \times 0.3}{0.47 \times (-0.53)} = -0.0939$$

したがって, $A_{525}^{M-R} = c (\epsilon_{525}^M - \epsilon_{525}^R)$, (曲線 1, 図 14b)

$$d = 0.094 \times \frac{c}{c^L} \quad (7)$$

α を (5) 式に代入する。

$$A^{11-9} = c^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R) - 0.094 \cdot c (\varepsilon^M - \varepsilon^R) \quad (8)$$

(8) 式で $c^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R)$ (曲線 2, 図 14b) と $c (\varepsilon^M - \varepsilon^R)$ (曲線 1, 図 14b) はわかっているのので, これらから A^{11-9} を再構成することが出来るはずである。その結果は Constituted curve (—○—; 図 14a) で, A^{11-9} (—●—; 図 14a) とよく一致している。つまり, lumi-br^t が meta-br^t と trans-br の両者に変化したという結論が正しかったことを示している。

2. β 及び $\frac{c^L}{c}$ を求めるための計算式

(5*) 式に (7) 式の α を代入して, β について整理する。

$$A^{11-9} = 0.094 \cdot c (\varepsilon^L - \varepsilon^M) + \beta \cdot c^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R)$$

$$\beta = \frac{A^{11-9} - 0.094 \cdot c (\varepsilon^L - \varepsilon^M)}{c^L (\varepsilon^L - \varepsilon^R)} \quad (9)$$

(9)式において, A^{7-9} , $\epsilon^L(\epsilon^L - \epsilon^R)$ は既にか
 っているので, $\epsilon^L(\epsilon^L - \epsilon^M)$ がわかれば β の値を
 求めることができる。 β がわかれば (3)式か
 ら α の値が求められ, α の値を (7)式に代入す
 れば $\frac{\epsilon^L}{\epsilon}$ を求めることができる。

ところが, 昇温実験の結果 (図 11, 13)
 からは $\epsilon^L(\epsilon^L - \epsilon^M)$ を求めることはできない。
 そこで著者らは別の方法によって lumi-br^t と
 meta-br^t の差吸収, $\epsilon^L(\epsilon^L - \epsilon^M)$ を求めた。 差
 吸収の求め方は別に記す (本節 4, p 56~)。

3. lumi-br^t , batho-br^t の吸収スペクトルを 求める。

(9)式を用いて, 540 nm から 650 nm の間の
 10 波長での数値を代入して β の値を得た。
 得られた β の値は 0.723 で, この値は lumi-
 br^t の 72.3% が直接 trans-br に変化したこと
 を示している。 α の値は 0.277 となり, こ
 の値を (7)式に代入して $\frac{\epsilon^L}{\epsilon}$ の値として 0.339
 を得た。 つまり, 図 13b の曲線 7 の試料は

33.9 % の lumi-bR^t と 66.1 % の trans-bR の混合物であることを示している。

lumi-bR^t の吸収スペクトルは図13bの曲線1から66.1 % にあたる trans-bR の吸収スペクトル (-90°C で測定したもの) を差し引いて求めた。 Batho-bR^t の吸収スペクトルは、光反応によって生成した batho-bR^t はすべて lumi-bR^t に変化したものと考え、図13aの曲線1から66.1 % にあたる trans-bR (-190°C で測定したもの) を差し引いて得た。

得られた吸収スペクトルは等しい濃度の trans-bR の吸収極大での吸光度を1.0として、図15に示した。こゝで得られた結果と、今まで報告された吸収スペクトルについては、第4章第4節で考察する。

4. lumi-bR^t と meta-bR^t との差吸収を求める方法

Trans-bR (10 mM) = 酸緩衝液, pH 6.8) を -70°C から -40°C までの種々の温度で >560

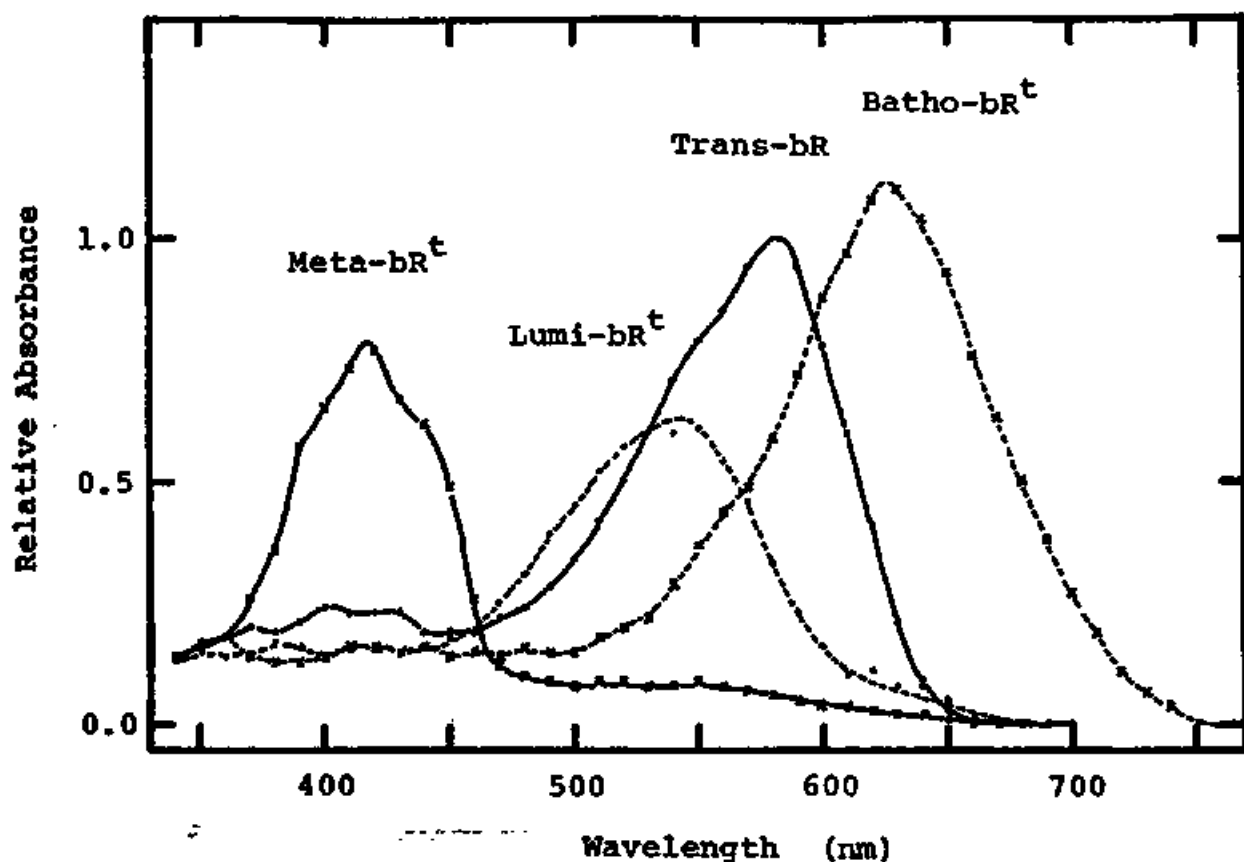
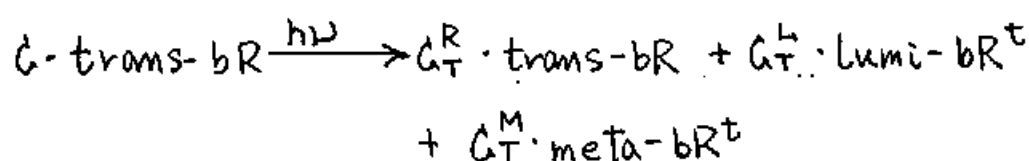


図 15 Trans-bR とその光反応中間体の吸収スペクトル
 Trans-bR (吸収極大, 583 nm)
 と batho-bR^t (626 nm) は -190°C での,
 Lumi-bR^t (543 nm) と meta-bR^t (418 nm)
 は -90°C での吸収スペクトルである。
 吸収スペクトルの高さは同じ温度での
 trans-bR の吸収極大波長での値を 1.0 とし
 て比較してある。

nmの光を用いて10分間照射した。図16aに照射前後の吸収スペクトルが示されている。この光照射によって起こる光反応は下記のように表わすことができる。



$$C = G_T^R + G_T^L + G_T^M$$

ここで、 C は最初の trans-bR のモル濃度であり、 G_T^R , G_T^L , G_T^M は $T^\circ C$ の光照射によって生成した光産物中の trans-bR, lumi-bR^t, meta-bR^t それぞれのモル濃度である。

いま、光産物の吸収スペクトルを見ると、510 nm 付近の吸光度は光照射の強度が高くなるにつれて減少していくが、一方それとは逆に410 nm 付近の吸光度は増加していく。これらの吸光度の増加は各々、lumi-bR^t, meta-bR^t の生成に対応するが、これらの温度による変化を図16a中の挿入図に示した。ここ

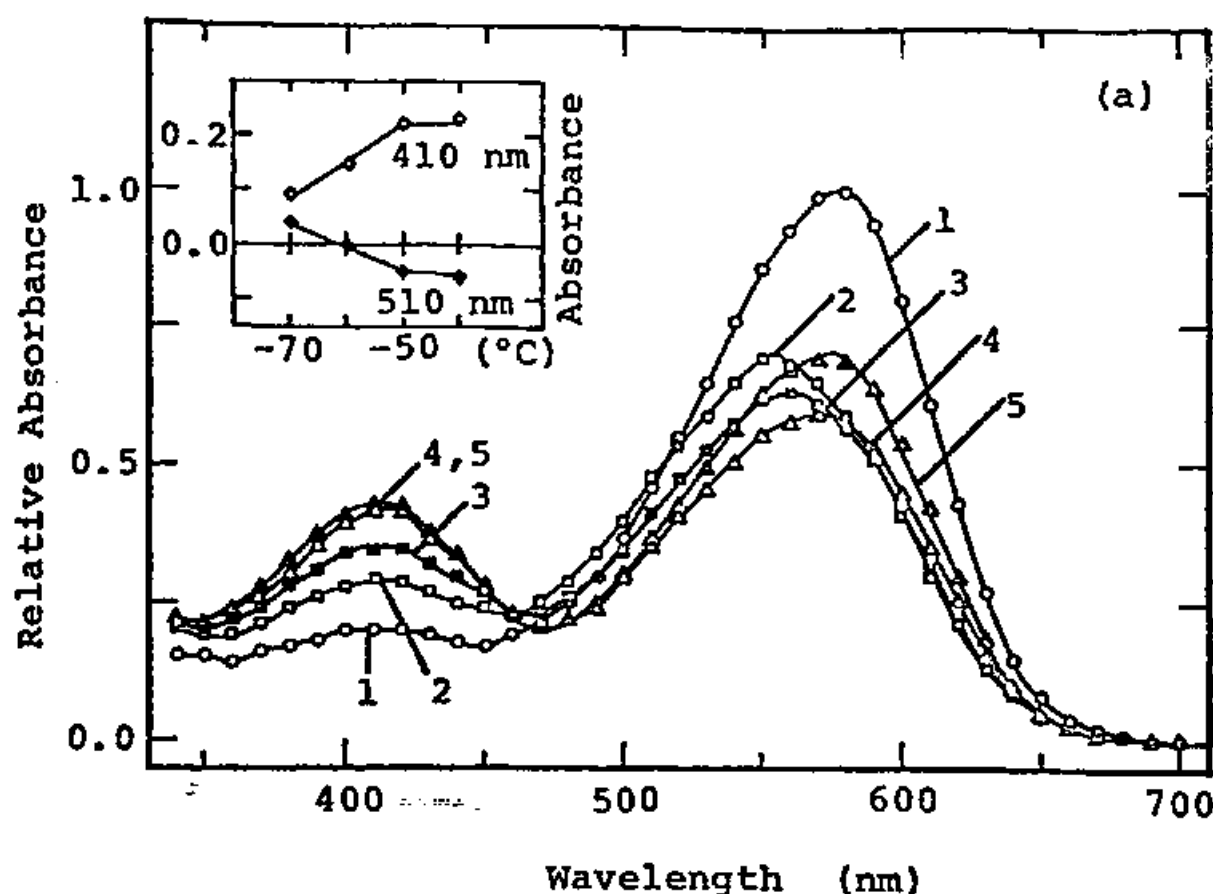


図 16a : Trans-bR (曲線 1, -70°C で測定) を種々の温度で 560 nm より長波長の光を用いて 10 分間照射して得られた吸収スペクトル。曲線 2~5 まで各々、 -70 , -60 , -50 , -40°C で照射した。挿入図はそれらの温度での光産物と trans-bR の 410 nm と 510 nm での吸光度の差を示している。

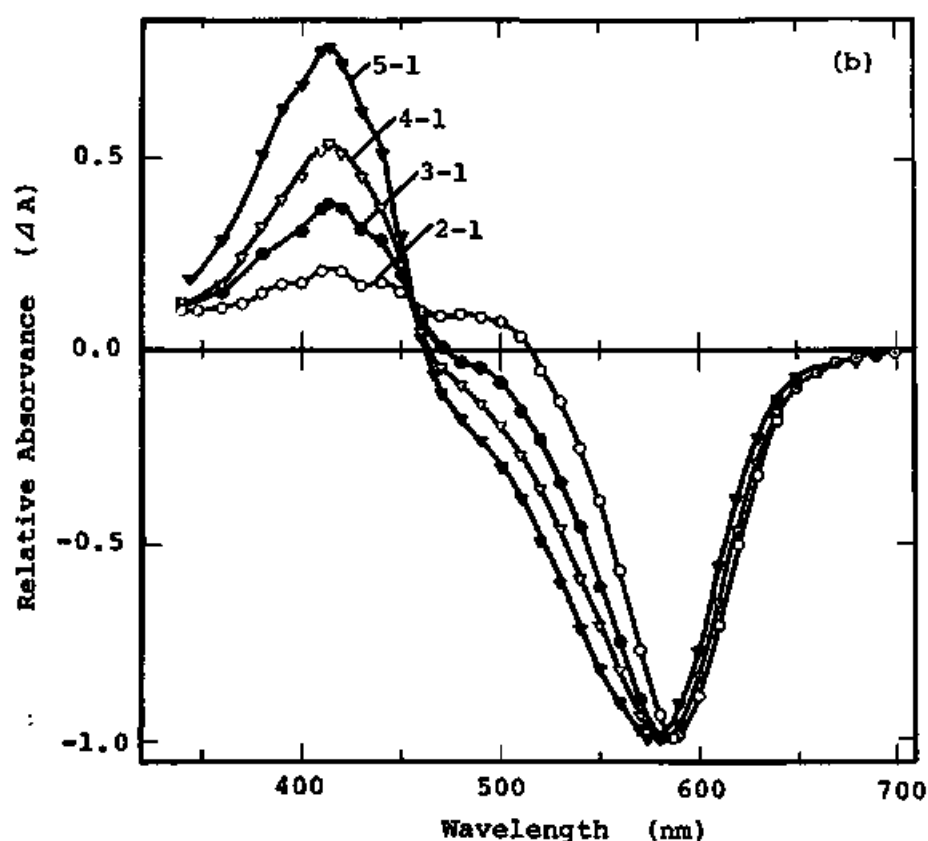


図 16b、種々の温度で trans-bR を 560nm より長波長の光で照射したときの差吸収スペクトル。曲線 2-1 ~ 5-1 まで、図 16a の曲線 1 と 2 ~ 5 までの各々の曲線との差吸収スペクトルである。すべて、その差吸収の極小の値を -1.0 にそろえてある。

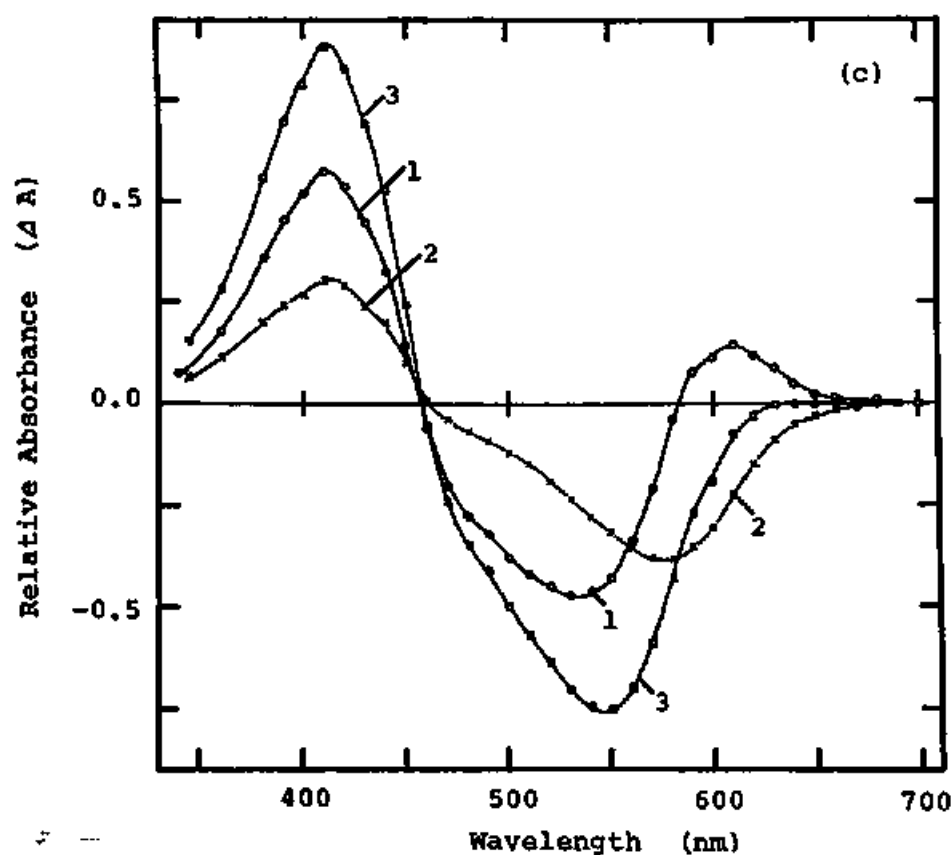


図 16c Lumi-bR^t と meta-bR^t の差吸収を求めるための図。 曲線 1 は図 16b の曲線 5-1 と曲線 2-1 との差吸収である。 曲線 2 は, 曲線 3 (Lumi-bR^t と meta-bR^t との差吸収) を求めるために利用した meta-bR^t と trans-bR の差吸収である。 詳しくは本文参照 吸収スペクトルの計算には曲線 3 を 0.365 倍したものを使用した。

で著者は ϵ_{-40}^L と ϵ_{-70}^M とは無視できる位小さいと仮定した。 $T^\circ C$ における光産物と trans-bR との差吸収は (10) 式のように表わすことができる。

$$(\epsilon_T^L \cdot \epsilon^L + \epsilon_T^M \cdot \epsilon^M) - (\epsilon - \epsilon_T^R) \cdot \epsilon^R \quad (10)$$

図 16b に示してあるように、差吸収の極小を -1.0 にそろえて、 $-70^\circ C$ 、 $-40^\circ C$ での差吸収 (曲線 2-1, 曲線 5-1) を (10) 式で表わす。

$$\text{曲線 2-1} \quad a \cdot \epsilon_{-70}^L \cdot (\epsilon^L - \epsilon^R)$$

$$\text{曲線 5-1} \quad b \cdot \epsilon_{-40}^M \cdot (\epsilon^M - \epsilon^R)$$

a と b は各々極小をそろえるための因子である。次に曲線 2-1 と曲線 5-1 の差を求める (曲線 1, 図 16c)。これを $\Delta^2 A$ と表わすことにする。

$$\Delta^2 A = b \cdot \epsilon_{-40}^M \cdot \epsilon^M - a \cdot \epsilon_{-70}^L \cdot \epsilon^L + (a \cdot \epsilon_{-70}^L - b \cdot \epsilon_{-40}^M) \epsilon^R$$

(11)

図 16c の曲線 1 で観察される 410 nm と 610 nm 付近のピークは (11) 式の第 1 項と第 3 項に、535 nm 付近のくぼみは第 2 項に対応する。

そこで、目的とする lumi-bR^t と meta-bR^t の差吸収を得るため $\Delta^2 A$ に $(a \cdot C_{70}^L - b \cdot C_{40}^M) (\epsilon^M - \epsilon^R)$ を加えた。

$$\begin{aligned} \Delta^2 A &+ (a \cdot C_{70}^L - b \cdot C_{40}^M) (\epsilon^M - \epsilon^R) \\ &= b \cdot C_{40}^M \cdot \epsilon^M - a \cdot C_{70}^L \cdot \epsilon^L + (a \cdot C_{70}^L - b \cdot C_{40}^M) \cdot \epsilon^M \\ &= a \cdot C_{70}^L (\epsilon^M - \epsilon^L) \end{aligned} \quad (12)$$

このとき加えた $(a \cdot C_{70}^L - b \cdot C_{40}^M) (\epsilon^M - \epsilon^R)$ は、 meta-bR^t と trans-bR の差吸収にある因子をかけたものであり、その因子、 $(a \cdot C_{70}^L - b \cdot C_{40}^M)$ 、は $\Delta^2 A$ の 630 nm より長波長側での吸光度の値が零になるように決定された (曲線 2、図 16c)。図 16c の曲線 1 に曲線 2 を加えたものが曲線 3 で、これが meta-bR^t と lumi-bR^t の

差吸収スペクトルである。

吸収スペクトルの計算に必要なのは、図 13 に示された昇温実験に用いた *trans*-bR と同じ濃度 (C) の *lumi*-bR^t と *meta*-bR^t の差吸収スペクトルである。つまり、 $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^L)$ が必要なので、 $A \cdot C \cdot l_{70}$ を Δ にする必要がある。

そこで、 $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^L)$ と $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^R)$ とは 525 nm で交わるはずである。なぜなら、 $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^L) - \Delta(\epsilon^M - \epsilon^R) = \Delta(\epsilon^R - \epsilon^L)$ であり、これは 525 nm で零になるからである (曲線 2 図 14b)。そこで、 $A \cdot C \cdot l_{70} (\epsilon^M - \epsilon^L)$ が 525 nm で $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^R)$ (曲線 1, 図 14b) と交わるように 0.365 倍して $\Delta(\epsilon^M - \epsilon^L)$ を得た。

第 3 節

Trans-bR の光感受性

既に述べたように、*trans*-bR の第一光産物は *batho*-bR^t であり、9 K での光照射によっても *batho*-bR^t の生成しか観察されなかった。

そして、9 K の batho- bR^t の生成量は 77 K (-190°C) の生成量と等しいことも既に述べた。この結果は trans- bR と batho- bR^t との光感受性の比がえるの温度で等しいことを示している。そこで、本節では、trans- bR 及び batho- bR^t の光感受性についてより詳しく調べた結果について述べる。

図 17 には 9 K と 77 K で測定された trans- bR と batho- bR^t の間の光反応が示されている。batho- bR^t の生成量や、吸収スペクトルの変化の様子は 9 K と 77 K とでほぼ同じである。

図 17 から 640 nm の吸光度の値を読み、その値を照射時間に対して片対数プロットした。

図 18 a には trans- bR から batho- bR^t への反応が示されている。9 K (○) も 77 K (●) も直線は得られなかった。77 K よりも 9 K の方が反応の後半部において反応速度の低下がより顕著に認められる。もしも、光反応が trans- bR と batho- bR^t との二者の間の単純な平衡反応ならば、片対数プロットは直線が得

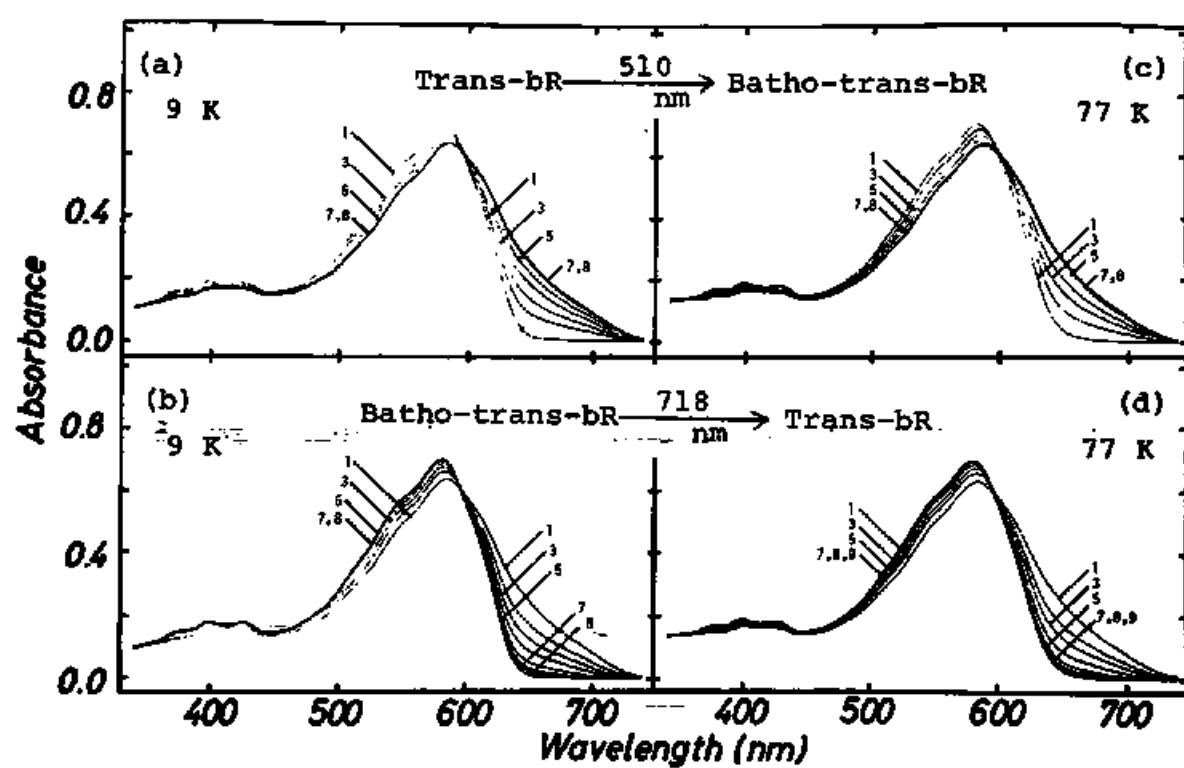


Fig. 17.

図 17 9 k と 77 k における trans-bR と batho-bR^t の間の光反応、すべて同一試料による測定である。

a: 9 k での trans-bR から batho-bR^t への光反応 Trans-bR (曲線 1) を 510 nm の光で合計、5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 秒照射して、それぞれ曲線 2~8 を得た。

b: 9 k での batho-bR^t から trans-bR への光反応、510 nm 光照射による光平衡産物 (曲線 1) に 718 nm の光を合計、10, 20, 40, 80, 160, 320 秒照射して、それぞれ曲線 2~7 を得た。さらに 660 nm より長波長の光で 10 分間照射して曲線 8 を得た。

c: 77 k での trans-bR から batho-bR^t への光反応 Trans-bR (曲線 1) に 510

nm の光を合計, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 秒照射して, それぞれ曲線 2 ~ 8 を得た。

d: 77 K の batho-bR^t から trans-bR への
光反応 510 nm 光照射による光平衡
産物 (曲線 1) に 718 nm の光を合計,
10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280
秒照射して, それぞれ曲線 2 ~ 9 を得
た。

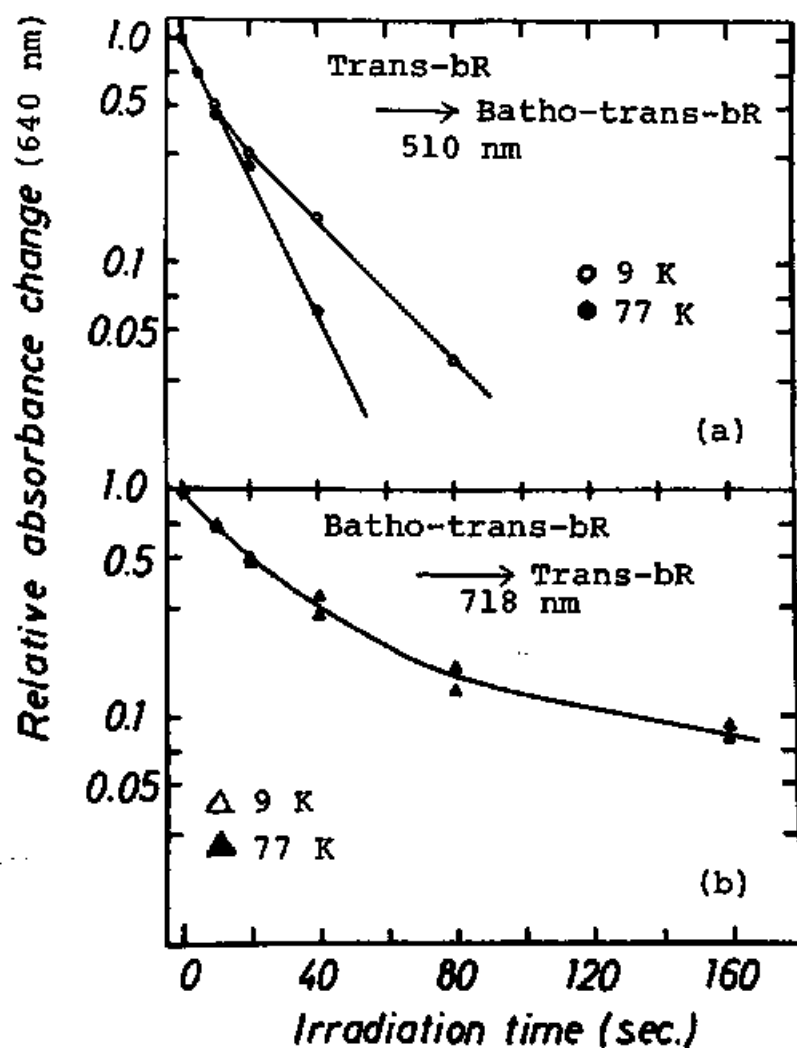


図 18 a: Trans-bR から batho-bR^t への光反応
の時間経過、○は 9 K, ●は 77 K.

これはこれを図 17 a と c の 640 nm の
吸光度がプロットされた。

b: Batho-bR^t から trans-bR への光反応
の時間経過、△は 9 K, ▲は 77 K.

これはこれを図 17 b と d の 640 nm の
吸光度がプロットされた。

られるはずである。直線が得られない原因は Hurley と Ebrey⁽¹⁶⁾ によって報告されているように、紫膜中で三量体をつくっている trans-bR から batho-bR^t への energy transfer によるものである。彼らによると、trans-bR から同じ三量体内の batho-bR^t へ energy transfer が起こり、batho-bR^t から trans-bR への逆反応を引き起こすため、反応過程の片対数プロットは直線にならないと結論された。すると、

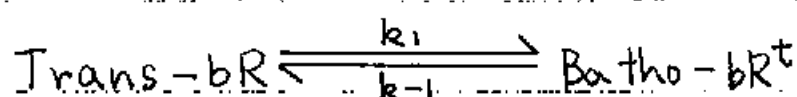
図 18a にみられる 9 K と 17 K での反応の後半部の傾きの違いは 9 K での energy transfer の効率が良くなっていることを示唆している。

ともかくも、trans-bR から batho-bR^t への光反応では、反応の後半部において差がみられるけれども、反応の初期の速さは等しいと結論できる。

一方、図 18b に示されているように、batho-bR^t から trans-bR への光反応の片対数プロットは 20 の温度で完全に一致したが、直線は得られなかった。この点については第

4章第3節で述べる。

さて, trans-bR と batho-bR^t の間の光反応を下記のように表わす。



k_1 , k_{-1} は反応の速度定数で次のように書き表わすことができる。

$$k_1 = I_n \cdot \varepsilon_{n,T}^{\text{trans}} \cdot \varphi_{n,T}^{\text{trans} \rightarrow \text{batho}} \quad (13)$$

$$k_{-1} = I_n \cdot \varepsilon_{n,T}^{\text{batho}} \cdot \varphi_{n,T}^{\text{batho} \rightarrow \text{trans}} \quad (14)$$

I , ε , φ はそれぞれ, 照射光強度, モル分子吸収系数, 量子収率を示す。添字 n , T , trans, batho はそれぞれ, 波長, 温度, trans-bR batho-bR^t を示す。また, trans \rightarrow batho, batho \rightarrow trans は trans-bR から batho-bR^t への, 又はその逆方向の反応を示す。本実験では照射光強度は一定であるので, k_1 , k_{-1} は量子収率とモル分子吸収系数の積 (光感受性) によっ

てきまる。

図 18a では照射に 510 nm の波長の光を用いているため、生成した batho- bR^t も光を吸収して反応すると考えられるので、フロットの傾きは $(k_1 + k_{-1})$ で表わされる。一方、図 18b では 718 nm の波長の光を照射に用いている。この波長の光は trans- bR に吸収されないのので、フロットは batho- bR^t のみの光反応を示しており、その傾きは k_{-1} で表わされる。

つまりに図 18a では $(k_1 + k_{-1})$ が、図 18b では k_{-1} が qk と $77k$ とで等しいことが示されている。ここで、 ϵ^{trans} , ϵ^{batho} とともに qk と $77k$ とではほとんど変化しない (図 17 参照) ので、結局、trans- bR と batho- bR^t との ϕ , 量子収率が qk と $77k$ とで等しいと結論できる。

第4章 議論と考察

第1節

Trans-bR の光化学反応中間体について

1. 中間体 "N", "O" が観測されなかったことについて

低温スペクトルの方法を用いた研究の結果, batho-, lumi-, meta-bR^t の3種の中間体の存在が確認された。ところが, フラッシュ・フォトリシスによる研究^(21, 40)で報告されている meta-bR^t から trans-bR への過程の中間体 "N", "O" を観測することはできなかった。この相異の原因として次の二つの可能性が考えられる。

一つは、meta-bR^t から "N" への反応の ΔG^\ddagger が -30°C 位の低温でも分子の熱振動で越えられるほど小さい場合である。このような場合には "N" の寿命は短くなり、すぐに次の中間体 "O" へと変化していく。この中間体

"N" の寿命が -30°C の値でも数秒というような単位であるなら、著者の用いた分光光度計 (Shimadzu MPS 5000) では測定することができないことになる。これと同様のことが中間体 "O" についてもあてはまる。もしそうならば、中間体 "O" を測定することも不可能である。ところが、動物のロトフシンの場合には熱反応の ΔG^{\ddagger} が十分に大きいため、低温スペクトルでもフラッシュフォトリシスによって同じ中間体を測定することが出来る⁽⁴¹⁾。

また、第2の可能性としては、 $\text{meta-bR}^{\text{t}}$ から直接 trans-bR にもどる反応経路と、中間体 "N" や "O" を通る経路の2つの平衡経路の存在が考えられる。この考えは中間体 "N" や "O" が by-product であると主張することになる。Sherman ら^(34,42) はバリイマイシンや Na^{+} が存在すると $\text{meta-bR}^{\text{t}}$ の寿命が長くなり、"O" の生成が阻害されること⁽⁴²⁾や、 $0 \sim 60^{\circ}\text{C}$ の範囲の測定では "O" の生成の time constant や活性化エネルギーが $\text{meta-bR}^{\text{t}}$ の崩壊のそれらと異

なる⁽³⁴⁾ことを見出した。彼らは“N”中間体を見出していないので、これらの結果から、“O”中間体が by-product である可能性を示唆している。他にも同様な可能性を示唆する示-
 一方法は多い^(33,38,43)が、それらについては本章第2節、光反応経路のところで述べる。

現在のところ、著者は第2の可能性が大きいと考えているが、前者もまちがいはないと思われる。

2. ヒフソ中間体が存在しないことについて

bR と同じくレタナールを発色団とする動物のロドプシンでは、ヒフソ中間体が第一光産物であることが最近報告されている^(25,26)。

ところが trans-bR ではヒフソ中間体は見出されなかった。Applebury らはピコ秒レーザーを用いた研究から、batho-bR^t の前駆体が 77K で 6 ピコ秒以内に生成し、11 ピコ秒のハーフタイムで batho-bR^t に変化すると報告している⁽⁴⁴⁾。そして、このものは batho-bR^t よりも長

波長側に吸収極大をもっているという。著者の実験では 9K ではこれに対応するものを見つけることはできなかった。Appleburyらは動物のロドプシンについても同様の報告を行っており、それについては励起一重項状態であると言っている⁽⁴⁵⁾。著者は trans-bR で根からの観察したものも恐らく励起一重項であり、trans-bR の第一光産物は batho-bR⁺ であろうと考えている。

Trans-bR が光を受けて、batho-, lumi-, meta-中間体と変化していく過程の吸収スペクトルの移動は動物のロドプシンとよく類似しているが、ヒトソ中間体を持たないという点でロドプシンとは異なる。ところで、ニワトリの錐体の視物質であるアイオドプシンもやはり 9K での光照射でヒトソ中間体を観察することができなさと報告されている⁽⁴⁶⁾。

さらに、trans-bR もアイオドプシンも batho-中間体から熱的に、レタナールと蛋白質とが解離することなく、もとの色素に変化する⁽⁴⁷⁾。

これらの類似性は、bRの発色団と蛋白質の相互作用の様式がロドプシンよりもアイオドプシンに近いことを示唆している。

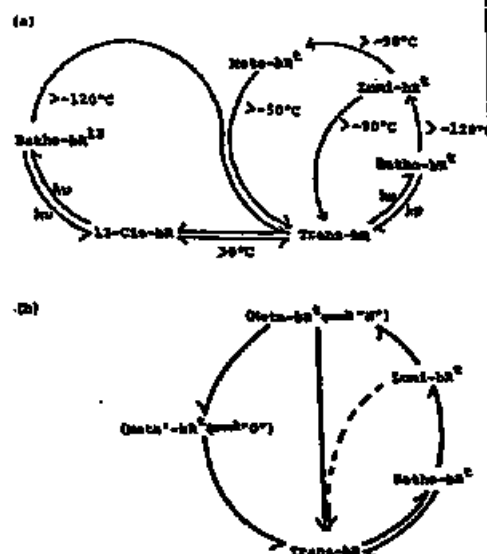
第2節

Trans-bRの光化学反応経路について

Trans-bRの光化学反応経路について多くの研究がなされてきているが、現在のところ一致した見解には達していない。低温スペクトルによる研究はLogierのカルーフ^(9,21), Gillbroのカルーフ⁽⁴⁸⁾と著者らのカルーフで行なわれているが、系統的に調べたものはこれが最初であると言っている。

著者らによって得られた結果は図19aにまとめられている。Trans-bRは光子を吸収してbatho-bR^tに変化し(33.4%),次に熱的にlumi-bR^tに変化する。この過程については各研究カルーフの間ではほぼ意見が一致している^(8,9)。ただ、Korenstein⁽³⁸⁾は、

Photoreaction Cycle of Bacteriorhodopsin



bR の光反応サイクル

- (a) 13-cis-bR と trans-bR の光反応サイクル
光反応は $h\nu$ で、熱反応は低温にしたときその反応が起こる温度で示してある。
- (b) Loxier 等によって閃光法により得られたスキームを比較しやすいように改定した。彼らはメタ中間体が2種類存在し (Meta-bR^N, Meta-bR^Q)、各々が "N", "Q" と平衡にあると考えている。この平衡物質のいずれから trans-bR にもどるかは判っていない。いずれも trans-bR より生じる中間体は -bR^N で 13-cis-bR より生じるものは -bR^Q で示してある。

図 19 bR の光反応サイクル、参考論文より転写。 a は著者らの得た光反応サイクル⁽⁷⁾, b は Loxier らによって最近提出された光反応サイクル⁽⁴³⁾ である。

レーガー光照射後の“M”の生成の time course が
 2つの成分で表わせることから, lumi-bR^t に
 2つの分子種が存在すると結論している。

しかし、彼らの結論はあまりに短絡的である
 と思われる。というのは、図18で示したよ
 うに batho-bR^t の生成は 9 K では直線にならな
 いが、これは必ずしも trans-bR に二分子種あ
 ることを示すものではない。既に述べたよ
 うに energy transfer の可能性もあることを指
 摘しておきたい。

このことは、 lumi-bR^t から後の過程で特
 に問題になってくる。著者らの実験結果で
 は、 lumi-bR^t の 72% が直接 trans-bR に変化し、
 残りが meta-bR^t に変化した。著者らはこの
 lumi-bR^t から trans-bR への反応経路の存在を
 初めて明らかにした。ただ、Lozier らは -
 20°C 以下では batho-bR^t の減少量に比べて meta-
 bR^t の生成量が少ないことから、 lumi-bR^t か
 ら trans-bR への反応経路の存在を考えている
 (43) (図 19b)。

lumi-br^t の次に生成してくる meta-br^t であるが、この meta -中間体が二分子種であると考えている人達がいる^(38, 43, 49)。彼らの論拠はいずれも、 meta-br^t の崩壊の time course が二成分になることである。さらに、Hoffmann ら⁽⁴⁹⁾ は、 meta-br^t の生成量と“0”中間体の生成量との比の値の温度変化を調べ、それが meta-br^t の崩壊の time course の2つの成分の構成比の温度変化と一致していることを見出した。これから、彼らは meta-br^t の一方が“0”中間体を生成して trans-br に変化し、他方は直接 trans-br に変化すると考えている。Logier らの考え⁽⁴³⁾ (図19b) も基本的には同じであると考えて良いと思われる。

ところが、著者は 0°C 以下の種々の温度で meta-br^t から trans-br への変化の time course を調べたが、片対数プロットで直線を得た。また、図12に示されている meta-br^t の変化も特に二分子種の存在を示唆してはいない。もし、 meta-br^t が二分子種であるとするなら

は、著者の得た結果は次のように説明できる。
つまり、 0°C 以下では meta-bR^t は直接 trans-bR
に変化する分子種になっている。ところが、
 0°C 以上の温度では "O" 中間体に変化する分
子種が増えてくる。このように考えれば、
一応矛盾なく説明できる。又、Shermanらに
よって⁽⁴²⁾、低温にあるほど "O" 中間体の生成
量が減少するという上記の考え方を支持する
結果も報告されている。

しかし、序論でも述べたように、中間体
"N" や "O" の吸収スペクトルが求められてい
ない上に、ほとんどすべての中間体の生成や
崩壊の time course の測定結果が二成分になっ
ている^(33,43) のであるから、また meta-bR^t 以降
については結論を出すことができないと言っ
るのが正しいであろう。

第3節

Trans-bR と batho-bR^t の間の光反応の
量子収率が温度に依存しないことについて

図 18 に示された結果から, trans-bR と batho-bR^t の間の反応の量子収率は 9 K と 77 K とでは同じであると結論した。さらに, Hurley らによると⁽⁵⁰⁾, trans-bR から batho-bR^t への反応の量子収率は 300 K と 77 K とでも等しいと報告されている。すると, trans-bR から batho-bR^t への反応の量子収率は 9 K から 300 K の広い温度領域にわたって一定であると結論できる。

図 18a に示されているように, 9 K での trans-bR から batho-bR^t への反応の片対数プロットは直線にならなかった。これについては Hurley と Ebrey がさらに詳しく調べている⁽¹⁶⁾。彼らは, 照射光の波長を変えると, trans-bR から batho-bR^t への反応の見かけ上の量子収率が変化することを見出した。彼らは, これは紫膜上の bR の三量体構造中で trans-bR から batho-bR^t へ energy transfer が起こるためであると説明し, 理論的計算を行なっている。著者らが図 18a の片対数プロットで直線を得

られなかった原因も二のためであると思われるが、さらに bR の単量体を用いて検証する必要があると考えている。

図 18b の batho-bR^t から trans-bR への反応の time course の片対数プロットが直線にならないのは、さらに奇妙なことである。二の場合には batho-bR^t しか光反応していないのであるから、energy transfer は起こり得ない。また、718 nm の batho-bR^t の吸収もわかかな値であるから、色素のフィルター効果ということも考えにくい。そこで著者はこの結果は 1 つの三量体の中に含まれている bR 分子間の相互作用によって起こるのではないかと考えている。つまり、三量体中の 3 分子の bR がすべて batho-bR^t の場合、1 分子だけが trans-bR に変化して残り 2 分子は batho-bR^t の場合、2 分子が trans-bR に変化して 1 分子のみが batho-bR^t の場合、これらの 3 つの場合においてそれぞれそこに含まれる batho-bR^t の光感受性が変化するのでないかという考えである。

Korenstein ら⁽⁵¹⁾は紫膜を試料として(三量体を用いて) meta-bR^tの崩壊の time course を理論的に取り扱い、著者の考えと同じようなことを報告している。この説明も単量体にした bR を用いて検証する必要があると考えている。

第4節

Trans-bR とその光反応中間体の 吸収スペクトルについて

Trans-bR とその光反応中間体の吸収スペクトルはいくつかのグループによって報告されてきた^(8~10)。彼らの結果と本論文のものを比較して表1にまとめた。測定温度が異なるので単純な比較はできないが、たとえば trans-bR の場合であれば、0°C から -190°C ままで冷却すると吸収極大波長は 10nm 長波長へ移動し、吸光度は 10% 位増加する⁽²¹⁾。

Chu Kung ら⁽⁸⁾は吸収スペクトルの計算方法を示していないので論じられえないが、trans-

	present work		Becher <u>et al.</u>		Chu Kung <u>et al.</u>		Lozier <u>et al.</u>	
	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$
trans-bR	583 (-190)	63	568 (23)	63	563 (-25)	63	570 (1)	63
batho-bR ^t	626 (-190)	69	628 (-196)	86	631 (-25)	78	590 (1)	53
lumi-bR ^t	543 (-90)	40	547 (-100)	51	520 (-25)	51	550 (1)	46
meta-bR ^t	418 (-90)	49	412 (-40)	45	418 (-25)	70	412 (1)	41
	low temperature spectrophotometry				flash photolysis			

表1 現在までに報告されたbRとその光反応
中間体の吸収スペクトルの比較。()の
中は測定温度を表わす。

bR の吸収極大波長が 563 nm というのは少し短波長すぎる。 13-Cis-bR の混在が考えられる。

Logier ら⁽⁹⁾ は trans-bR の量子収率が波長によって変化しないと仮定して batho-bR^t の吸収スペクトルを求めた。 もし、量子収率が波長に依存しないならば、種々の波長の光で照射したときの光平衡状態の吸収スペクトルから batho-bR^t の吸収スペクトルを計算する方法がある⁽⁵²⁾。ところが、Hurley と Ebrey⁽¹⁶⁾ によると、trans-bR から batho-bR^t への光反応の量子収率は trans-bR から batho-bR^t への energy transfer が起るため波長によって変化する。そのため、Logier らの計算した batho-bR^t の吸収スペクトルは正しくない。

また、Becher ら⁽¹⁰⁾ は光反応した trans-bR はすべて meta-bR^t に変化すると仮定して光反応量を求め、吸収スペクトルを計算した。

この仮定によると、光反応量は実際の値よりも小さくなるので、モル分子吸光系数は実際の値よりも大きくなってしまふ。

bRの光反応の量子収率もいろいろの値が報告されている。Meta-bR⁺の生成に対しては、0.79 (エーテル溶液中)⁽³⁷⁾, 0.5以下⁽⁹⁾, 0.30 ± 0.03 (-40°C)⁽³⁹⁾, 0.25 ± 0.05 (室温)⁽⁵³⁾などの量子収率の値が報告されている。

また、HessとKushmitz⁽⁵⁴⁾は二種類のmeta-bR⁺に対して -40°C で 0.93 ± 0.35 , 0.77 ± 0.08 という量子収率の値を報告しているが、どのようにして二種の分子種それぞれについて求めたかは明確では~~ない~~。このように量子収率の値が異なる原因はいろいろあると思われるが、光反応量を求めるところが大きな原因の一つに~~な~~っていると考えられる。そういう点で著者の提出した吸収スペクトルは光反応の基礎的資料を与えるものである。

第5章 要約

低温スペクトルの手法を用いて trans-bR の光化学反応とそれに続く熱反応について調べた。

液体ヘリウム温度 (4 K) と液体窒素温度 (77 K, -190°C) で調べた結果、動物のロドプシンで観察されるようなヒポソ中間体は見出されなかった。Trans-bR に 4 K で光を照射すると batho-bR^t が生成する。この生成量は 77 K での生成量とほぼ等しかった。この結果から、batho-bR^t が trans-bR の第一光産物であること、及び、trans-bR と batho-bR^t の光感受性の比が 4 K と 77 K とではほぼ等しいことが結論された。

次に、batho-bR^t の熱反応を、段階的に昇温させては冷却して一定温度で吸収スペクトルの変化を観察するという方法で調べた。

Batho-bR^t は -120°C から lumi-bR^t に変化した。

Lumi-bR^t は -90°C から変化する。この

とき、一部は meta-bR^t に変化するが、残りは直接 trans-bR に変化することが、 meta-bR^t を安定化させた試料 (1 M. NaCl, 10 mM. ホレ-ト緩衝液, pH 10 にけん濁した紫膜) を用いた実験から明らかになった。 Meta-bR^t は -50°C から trans-bR へ変化する。

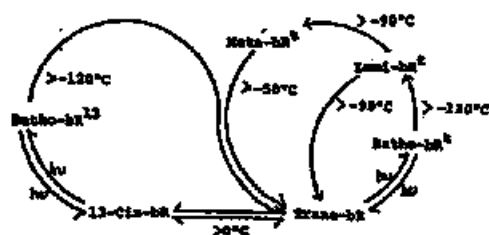
この光反応経路を解析することによって、 trans-bR の光反応量を正確に求め、 -190°C での batho-bR^t (吸収極大 626 nm) と、 -90°C での lumi-bR^t (吸収極大 543 nm) の吸収スペクトルを計算して求めた。

9 K と 77 K での trans-bR と batho-bR^t との光反応を詳しく調べ、それらの光反応速度は両温度で等しいと結論できる結果を得た。反応時の光の強さが一定であり、また、その分子の吸収係数は 9 K と 77 K とではほとんど変化しないので、この結果は trans-bR と batho-bR^t の量子収率が両温度で等しいことを示している。また、この実験において、三量体の中の bR 分子間には相互作用があることを示唆

する結果を得た。一つの相互作用は三量体中の trans-bR から batho-bR^t への energy transfer であると思われるが、さらに異なる種類の相互作用のあることが示唆された。つまり、三量体の中の trans-bR と batho-bR^t の割合に応じて、batho-bR^t の光感受性に違いが生じてくると考えられる。

以上 得た結果から bR の光化学反応経路について考察した。特に特定波長での吸光度変化の追跡だけで光反応経路を決定することの問題点が指摘された。著者の主張する bR の光反応経路を下に示す。

Photoconversion Cycle of Bacteriorhodopsin



第 6 章 謝 辞

著者は本研究を指導して下さい下さった吉沢透教授、今は東北大学におられる徳永史生助教授、短かい間ではあったが研究についていろいろと考えさせて下さったイリノイ大学の Ebrey 教授に深く感謝します。

また、何かと著者の研究について有益な議論や助言を下さった前田章夫助教授、七田芳則博士をはじめとする吉沢研究室の皆さん、それ以外の多くの友人達に深く感謝したいと思います。

第 17 章 文 献

(1) Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971)
Nature New Biol. 233, 149-152

(2) Blau lock, A. E. (1975) J. Mol. Biol. 93,
139-158

(3) Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 2853-2857

(4) Danon, A. and Stoeckenius, W. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 1234-1238

(5) Iwasa, T., Tokunaga, F. and Yoshizawa, T.
(1979) FEBS Lett. 101, 121-124

(6) Iwasa, T., Tokunaga, F., Yoshizawa, T. and
Ebrey, T. G. (1980) Photochem. Photobiol. 31,
83-86

(7) Iwasa, T., Tokunaga, H. and Yoshizawa, T.
submitted to Biophys. Struct. Mech.

(8) Chu Kung, M., Devault, D., Hess, B. and
Desterhelt, D. (1975) Biophys. J. 15,
907-911

(9) Lozier, R. H. and Niederberger, W. (1972)
Fed. Proc. 36, 1805-1809

(10) Becher, B., Tokunaga, H. and Ebrey, T. G.
(1978) Biochemistry 17, 2293-2300

(11) Usukura, J., Yamada, E., Tokunaga, H.,
Iwasa, T. and Yoshizawa, T.: 6th Int. Cong.
Biophys. (1978)

(12) Henderson, R. and Unwin, P. N. T. (1975)
Nature 257, 28-32

- (13) Unwin, P. N. T. and Henderson, R (1975)
J. Mol. Biol. 94, 425-440
- (14) Becher, B. and Ebrey, T. G. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 1-6
- (15) Ebrey, T. G., Becher, B., Mao, B., Kilbride, P. and Honig, B. (1977) J. Mol. Biol. 112, 377-397
- (16) Hurley, J. B. and Ebrey, T. G. (1978)
Biophys. J. 22, 49-66
- (17) Ouchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., Feigina, M. Y., Kiselev, A. V. and Lobanov, N. A. (1979)
FEBS Lett. 100, 219-214.
- (18) Khorana, H. G., Genber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.

76, 5046 - 5050

(19) Maeda, A., Iwasa, T. and Yoshizawa, T. (1977)
J. Biochem. (Tokyo) 82, 1599 - 1604

(20) Pettei, M. J., Yudd, A. P., Nakanishi, K.,
Henselman, R. and Stoekenius, W. (1977)
Biochemistry 16, 1955 - 1959.

(21) Tokunaga, H., Iwasa, T. and Yoshizawa, T.
(1976) FEBS Lett. 72, 33 - 38

(22) Sperling, W., Carl, P., Rafferty, Ch. N. and
Dencher, N. A. (1977) Biophys. Struct. Mech.
3, 79 - 94

(23) Yoshizawa, T. and Kitô, Y. (1958)
Nature 182, 1604 - 1605

(24) Yoshizawa, T. and Horiuchi, S. (1973)

in: Biochemistry and Physiology of Visual Pigment (Hager, H. ed.) pp. 69-81, Springer-Verlag. Berlin.

(25) Shichida, Y., Yoshizawa, T., Kobayashi, T., Ohtani, H. and Nagakura, S. (1977) FEBS Lett. 80, 214-216

(26) Kobayashi, T. (1979) FEBS Lett. 106, 313-316

(27) Lofter, R. H., Bogomolnı, R. A. and Stoeckenıus, W. (1975) Biophys. J. 15, 955-962

(28) Stoeckenıus, W., Lofter, R. H. and Bogomolnı, R. A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 505, 215-278

(29) Lewis, A., Spoonhower, J., Bogomolnı, R. A., Lofter, R. H. and Stoeckenıus, W. (1974)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 4462-4466

(30) Mendelsohn, R. (1976) Biochim. Biophys.
Acta 427, 295-231

(31) Marcus, M. and Lewis, A. (1977) Science
195, 1328-1330

(32) Lozier, R. H., Niederberger, W., Bogomolni, R. A.,
Hwang, G. and Stoeckenius, W. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 440, 545-556

(33) Ort, D. R. and Parson, W. V. (1978) J.
Biol. Chem. 253, 6158-6164

(34) Sherman, W. V., Korenstein, R. and Caplan, S.
R. (1976) Biochim. Biophys. Acta 430,
454-458

(35) Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974)

in: Methods in Enzymology (Fleischer, S. and
Packer, L., eds.) Vol. XXXI, pp. 667-678,
Academic Press, New York

(36) Yoshizawa, T. (1972) in: Handbook of
Sensory Physiology, VII/1, (Dartnall, H. J. A.
ed.) pp. 69-81, Springer, Berlin.

(37) Oesterheld, D. and Hess, B. (1973) Eur. J.
Biochem. 37, 316-326

(38) Korenstein, R., Hess, B. and Kushimizu, D.
(1978) FEBS Lett 93, 266-270

(39) Becher, B. and Ebrey, T. (1977)
Biophys. J. 17, 185-191

(40) Dencher, N. and Wilms, M. (1975)
Biophys. Struct. Mech. 1, 259-271

(41) Cone, R. A. (1972) Nature New Biol.
236, 39-43

(42) Sherman, W. V., Silfkin, N. A. and Caplan, S.
R. (1976) Biochim. Biophys. Acta 423,
238-248

(43) Lozier, R. H., Niederberger, W., Ottolenghi, M.,
Sivorinovskiy, M. and Stoeckenius, W. (1978)
in: Energetics and Structure of Halophilic
Microorganisms (Caplan, S. R. and Ginzburg,
M. eds.) pp 123-139, North-Holland Bio-
medical Press, Elsevier.

(44) Applebury, M. L., Peters, K. S. and Rentzepis,
P. M. (1978) Biophys. J. 23, 375-382

(45) Busch, G. E., Applebury, M. L., Lamola, A. A.
and Rentzepis, P. M. (1972) Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. 69, 2802-2806

(46) Tsukamoto, Y., Horinuchi, S. and Yoshizawa, T.
(1975) Vision Res. 15, 819-823

(47) Yoshizawa, T. and Wald, G. (1967)
Nature 214, 566-571

(48) Kriebel, A. N., Gillbro, T. and Wild, U. P.
(1979) Biochim. Biophys. Acta 546, 106-120

(49) Hoffman, W., G-Miguel, M., Barnard, P. and
Chapmann, D. (1978) FEBS Lett 95,
31-34

(50) Hurley, J. B., Ebrey, T. G., Honig, B. and
Otto Lenghi, M. (1977) Nature 270,
540 - 542

(51) Korenstein, R., Hess, B. and Markus, M.
(1979) FEBS Lett. 102, 155-161

(52) Fisher, E. (1967) J. Physiol. Chem. 71,
3704 - 3706

(53) Goldschmidt, C R., Kalisky, O., Rosenfeld, T.
and Ottolenghi, M. (1977) Biophys. J. 17,
179 - 183

(54) Hess, B. and Kushimtz, P. (1977) FEBS
Lett. 74, 20 - 24